



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YENİ NESİL NANOHİBRİT MALZEMELERİN ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

İlknur AKSOY

YÜKSEK LİSANS

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Ağustos-2020
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

YENİ NESİL NANOHİBRİT MALZEMELERİN ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

İlknur AKSOY

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İmren HATAY PATIR

2020, 95 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. İmren HATAY PATIR
Dr. Öğr. Üyesi Fatih SEVGİ
Dr. Öğr. Üyesi Fatih ERCİ

İki boyutlu bir yarı iletken olan siyah fosfor 2014 yılındaki ilk başarılı sentezinden bu yana bilim dünyasının dikkatini çekmektedir. Siyah fosfor (BP) ince ve katmanlı bal peteği şeklindeki yapısı, mükemmel fiziksel ve kimyasal özellikleri ve insan vücudu ile biyouyumlu olması sayesinde biyoteknoloji ve tıp alanlarında umut verici bir nanomalzemedir. Öte yandan bakterilerin geliştirdiği antibiyotik direnci, antibakteriyel tedavide karşılan en büyük problemlerden biridir. Son yıllarda nanomalzemeler, antibiyotik ilaçlara alternatif yaklaşımlarda çözüm odağı haline gelmiştir.

Bu çalışmada BP nanotabakaları, BP-Au ve BP-Ag nanohibritlerinin 808 nm dalga boylu yakın kızılötesi (NIR) ışık etkisinde *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* ve MRSA üzerinde gösterdiği antibakteriyel/antibiyofilm aktivitesi araştırılmıştır. BP kristallerinin oksijensiz su içerisinde sonike edilmesiyle BP nanotabakaları oluşturulmuştur. Ayrı bir düzenekte Au ve Ag NP'lar sentezlenip, BP/Au ve BP/Ag nanohibritlerinin elde edilmesi için sıvı-faz kendi kendine birleştirme yöntemiyle BP üzerine eklenmiştir. BP ve BP/Au nanomalzemeleri geçirimli elektron mikroskopisi (TEM), X-ışınları kırınımı (XRD) ve Raman, zamana bağlı emisyon (TRES), UV-Vis-NIR spektroskopisi ve endüktif olarak eşleşmiş plazma kütle spektrometresi (ICP-MS) teknikleriyle karakterize edilmiştir. Hazırlanan nanomalzemelerin antibakteriyel aktiviteleri optik yoğunluk ölçümü ve koloni sayımı metotları ile incelenmiştir. Malzemelerin her birinin NIR ışık etkisi altındayken ışık olmadığı duruma göre daha yüksek bir antibakteriyel performans gösterdiği bildirilmiştir. Bakteriler üzerinde BP/Au ve BP/Ag nanohibritlerinin yalın haldeki BP'ye göre daha etkili olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca fototermal etki ölçümü, oksidatif stres deneyi, floresan ve taramalı elektron mikroskopisi (SEM) teknikleri kullanılarak malzemelerin antibakteriyel mekanizmaları araştırılmıştır. Antibakteriyel etkide nanomalzemelerin sahip olduğu fototermal etki, oksidatif stres oluşturma ve bakteriyel membrana hasar verme kabiliyetlerinin önemli rol oynadığı belirtilmiştir. Ayrıca bu malzemelerin biyofilm oluşumunu inhibe edebilme özellikleri kristal viyole boyama yöntemi kullanılarak incelenmiştir. BP'nin ve BP/Ag'nin (64 µg/ml konsantrasyonunda) *S. aureus* ve BP/Au'nun *E. faecalis* bakterilerinin oluşturduğu biyofilmlerin yarısından fazlasını inhibe ettiği gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: altın nanoparçacık, antibakteriyel aktivite, gümüş nanoparçacık, nanohibrit, siyah fosfor

ABSTRACT

MS THESIS

INVESTIGATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITIES of NEW GENERATION NANOHYBRID MATERIALS

Ilknur AKSOY

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

Advisor: Prof. Dr. Imren HATAY PATIR

2020, 95 Pages

Jury
Advisor Prof. Dr. Imren HATAY PATIR
Assistant Prof. Dr. Fatih SEVGI
Assistant Prof. Dr. Fatih ERCI

Black phosphorus (BP), a two-dimensional semiconductor, has attracted the attention of the science world since its first successful synthesis in 2014. BP is a promising nanomaterial in biotechnology and medicine owing to its thin and layered honeycomb structure, excellent physical and chemical properties, and biocompatibility with human body. On the other hand, antibiotic resistance developed by bacteria is one of the biggest problems encountered in antibacterial treatment.

Herein, the antibacterial/antibiofilm activity of BP, BP-Au and BP-Ag nanocomposites on *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* and MRSA under the effect of near-infrared (NIR) light with a wavelength of 808 nm. BP crystals were sonicated in deoxygenated water to obtain BP nanosheets. In another setup, Au and Ag nanoparticles were synthesized and anchored on BP via the liquid self-assembly method to yield BP/Au and BP/Ag nanohybrids. BP and BP/Au were characterized by X-ray diffraction (XRD), transmission electron microscopy (TEM), and Raman, UV−vis−NIR, time-resolved emission (TRES), and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) techniques. Antibacterial activities of the nanomaterials were examined by optical density measurement and colony counting methods. Each of the materials has a higher antibacterial performance when under the influence of NIR light than when there is no light. BP/Au and BP/Ag nanohybrids are more effective on bacteria than bare BP nanosheets. In addition, antibacterial mechanisms of materials were investigated using photothermal effect measurement, oxidative stress test, fluorescence and scanning electron microscopy (SEM) techniques. Photothermal effect, oxidative stress and bacterial membrane damage mechanisms play significant role in the antibacterial effect. Also, biofilm inhibition capability of nanomaterials was examined by crystal violet assay and it was reported that BP and BP/Ag (64 µg/ml) inhibit more than half of the biofilms formed by *S. aureus* and BP/Au's *E. faecalis* strains.

Keywords: antibacterial activity, black phosphorus, gold nanoparticles, nanohybrids, silver nanoparticles

ÖNSÖZ

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Bölümü öğretim üyesi sayın Prof. Dr. İmren HATAY PATIR danışmanlığında hazırlanmış olup Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne Yüksek Lisans Tezi olarak sunulmaktadır.

Öncelikle bu tez çalışmasının oluşmasının yolunu açan ve çalışma boyunca değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam kıymetli vaktini ayırıp ilgi ve sabırla dinleyen ve bana yardımcı olabilmek için elinden gelenin fazlasını yapan, güler yüzünü ve içtenliğini esirgemeyen kıymetli hocam ve danışmanım Prof. Dr. İmren HATAY PATIR'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmamın ilk günlerinde bana laboratuvarının kapısını açan ve çalışma boyunca yöntem konusunda bana sabırla yol gösterip değerli zamanını benim çalışmam için ayıran Dr. Öğr. Üyesi Fatih SEVGİ'ye teşekkür ederim.

Tez çalışmamda kullanmış olduğum nanomalzemelerin sentezi ve karakterizasyonu konusunda destek olan Koç Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyesi saygıdeğer Doç. Dr. Önder METİN'e ve sentez ve karakterizasyonu yapıp her soru ve sorunumda yardımcı olan Arş. Gör. Hüseyin KÜÇÜKKEÇECİ'ye teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmam boyunca benden manevi destek ve dostluklarını esirgemeyen değerli dostlarım yüksek lisans öğrencisi Ayşe KAYAN'a ve doktora öğrencisi Alev GÜL'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışma için maddi destek sağlayan Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü'ne (BAP-19101006 nolu proje) katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tüm bu yorucu süreçte beni önemseyen, sabırla beni dinleyip koşulsuz şartsız her zaman desteğini yanımda hissettiğim, zor günlerimi kolaylaştıran sevgili Hikmet ÇEKCEOĞLU'na teşekkür ederim.

Ve son olarak, aldığım tüm kararlarımda beni destekleyerek bugünlere gelmemde payları büyük olan, tez çalışmam ve hayatım boyunca bana güç veren sevgili babam Ahmet AKSOY; annem Ayşe AKSOY ve abim İlker AKSOY'a şükranlarımı sunuyor ve bu çalışmamı onlara ithaf ediyorum.

İlknur AKSOY

KONYA-2020

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **viii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **xi**

1. GİRİŞ **1**

1.1 Nanomalzemeler 2
1.1.1. Yeni Nesil Nanomalzemeler: Siyah Fosfor 3
1.1.1.1 Siyah Fosforun Yapısal Özellikleri 5
1.1.1.2. Siyah Fosforun Uygulama Alanları 6
1.1.2. Altın ve Gümüş Nanoparçacıklar 6
1.2. Nanomalzemelerin Antibakteriyel Etkisi 8
1.2.1. Fototermal Etki 10
1.2.2. Oksidatif Stres (Reaktif Oksijen Türleri Oluşumu) 11
1.2.2.1. Glutatyon (GSH) 12
1.2.3. Nanobıçak Etki ve Membran Hasarı 13
1.3. Çalışmada Kullanılan Bakterilerin Karakteristik Özellikleri 15
1.3.1. *Escherichia coli* 15
1.3.2. *Enterococcus faecalis* 15
1.3.3. *Staphylococcus aureus* 16
1.3.4. Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) 16
1.4. Biyofilm 17
1.4.1. Biyofilm Oluşumu ve Önemi 17
1.4.2. Biyofilm ve İlaç Direnci 18
1.4.3. Bakteriyel Biyofilmlerin Tedavisinde Nanomalzemeler 19
1.4.4. Nanomalzemelerin Antibiyofilm Özellikleri ve Uygulamaları 20

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **21**

2.1. Siyah Fosfor ile yapılan Biyolojik Çalışmalar 21
2.2. Siyah Fosfor ile yapılan Antibakteriyel Etki Çalışmaları 23
2.2. Siyah Fosfor ve Altın/Gümüş Nanoparçacıkları ile Yapılan Antibakteriyel Çalışmalar 27
2.3. Siyah Fosfor Benzeri Maddelerle Yapılan Antibiyofilm Çalışmaları 29
2.3.1. Grafen Oksit (GO) Tabanlı Antibiyofilm Çalışmaları 29
2.3.2. Titanyum dioksit (TiO_2) Tabanlı Antibiyofilm Çalışmaları 30
2.3.3. Molibden disülfür (MoS_2) Tabanlı Antibiyofilm Çalışmaları 30

3. MATERYAL VE YÖNTEM **32**

3.1. Kullanılan Kimyasallar 32
3.2. Kullanılan Cihazlar 32

3.3. Biyolojik Çalışmalarda Kullanılan Mikroorganizmalar 33
3.4. Analiz Metotları 33
3.4.1. Geçirimli Elektron Mikroskopisi (TEM) 33
3.4.2. X Işınları Kırınımı (XRD) 33
3.4.3. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) 33
3.4.4. Raman Spektroskopisi 34
3.4.5. Zamana Bağlı Emisyon Spektroskopisi (TRES) 34
3.4.6. Spektrofotometri 34
3.4.7. Floresan Mikroskopisi 34
3.5. Nanomalzemelerin Sentezlenmesi 34
3.5.1. Siyah Fosfor (BP) Kristali ve Nanotabakaları Sentezi 34
3.5.2. Altın Nanoparçacıklarının (Au NP) Sentezi 35
3.5.3. Gümüş Nanoparçacıklarının (Ag NP) Sentezi 35
3.5.4. Siyah Fosfor/Altın Nanokompozit (BP/Au) Hazırlanışı 35
3.5.5. Siyah Fosfor/Gümüş Nanokompozit (BP/Ag) Hazırlanışı 36
3.5.6. Sentezlenen Yapıların Karakterizasyonu 36
3.6. Fototermal Etki Ölçümü 36
3.7. Antibakteriyel Aktivite Analizleri 37
3.7.1. Bakteri Kültürü Hazırlama 37
3.7.2. Bakteri Optik Yoğunluğunun (OD600nm) Ölçümü 37
3.7.2.1. Yöntemin Esası 37
3.7.2.2. Yöntemin Uygulanışı 38
3.7.3. Koloni Sayım Yöntemi 38
3.7.3.1. Yöntemin Esası 38
3.7.3.2. Yöntemin Uygulanışı 38
3.7.4. Floresan Mikroskopisi 39
3.7.4.1. LIVE/DEAD Boyama 40
3.7.4.1.1. Yöntemin Esası 40
3.7.4.1.2. Yöntemin Uygulanışı 40
3.7.5. Bakteri Hücrelerinin Morfolojik Karakterizasyonu (SEM) 40
3.8. Glutatyon Tükenme Deneyi (Oksidatif Stres Analizi) 41
3.8.1. Yöntemin Esası 41
3.8.1. Standart Eğri Hazırlama 41
3.8.2. GSH Tükenme Deneyi 41
3.9. Antibiyofilm Aktivite 42
3.9.1. Kristal Viyole Deneyi 42
3.9.1.1. Yöntemin Esası 42
3.9.1.2. Yöntemin Uygulanışı 42
3.9.2. İstatistiksel Analiz 43

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 44

4.1. BP ve BP-Au Nanomalzemelerinin Yapısal Analizleri 44
4.1.1. TEM Analiz Sonuçları 44
4.1.2. XRD ve Raman Analiz Sonuçları 45
4.1.3. Uv-Vis-NIR Spektroskopisi Sonuçları 46
4.1.4. TRES Analiz Sonuçları 47
4.2. BP, BP-Au ve BP-Ag Nanomalzemelerinin *E. coli, E. faecalis, S. aureus ve MRSA* üzerindeki Antibakteriyel Aktivitesi 48
4.2.1. Fototermal Etki Sonuçları 48

4.2.2. Bakteri Büyüme Eğrisi Sonuçları 50
4.2.2.1. *Escherichia coli* 50
4.2.2.2. *Enterococcus faecalis* 53
4.2.2.3. *Staphylococcus aureus* 56
4.2.2.4. Metisiline Dirençli *Staphylocccus aureus* 58
4.2.3. Koloni Sayımı Sonuçları 61
4.2.3.1. *Escherichia coli* 61
4.2.3.2. *Enterococcus faecalis* 62
4.2.3.3. *Staphylococcus aureus* 63
4.2.3.4. Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* 64
4.2.4. Floresan Mikroskopisi Sonuçları 65
4.2.4.1. BP, BP/Ag ve BP/Au malzemelerinin *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus ve* Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşları Üzerindeki Antibakteriyel Etkilerinin Floresan Mikroskobunda İncelenmesi 66
4.2.5. SEM Görüntüleri 68
4.2.6. Oksidatif Stres Analizi Sonuçları 70
4.3. BP, BP-Au ve BP-Ag Nanomalzemelerinin Antibiyofilm Aktivitesi 73
4.3.1. BP, BP-Au ve BP-Ag Nanomalzemelerinin *Enterococcus faecalis* Bakterisinin Oluşturduğu Biyofilm Üzerindeki İnhibisyon Etkisi 73
4.3.1. BP, BP-Au ve BP-Ag Nanomalzemelerinin *Staphylococcus aureus* Bakterisinin Oluşturduğu Biyofilm Üzerindeki İnhibisyon Etkisi 74

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 76

5.1 Sonuçlar 76
5.2 Öneriler 82
KAYNAKLAR 83

ÖZGEÇMİŞ 94

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

A: Absorbans
Å: Angstrom
eV: Elektronvolt
kV: Kilovolt
mg: Miligram
mmol: Milimol
ml: Mililitre
nm: Nanometre
µg: Mikrogram
µm: Mikrometre
µM: Mikromolar
µl: Mikrolitre
W: Watt
°C: Santigrat Derece
ΔT: Sıcaklık Değişimi

Kısaltmalar

Anti-Mb: Myoglobülin Antikoru
Ar: Argon Gazı
ATCC: Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
ATP: Adenozin trifosfat
Au NP: Altın Nanoparçacıklar
Ag NP: Gümüş Nanoparçacıklar
BP: Siyah Fosfor
BP/Ag: Siyah Fosfor/Gümüş Nanohibridi
BP/Au: Siyah Fosfor/Altın Nanohibridi
BPQD: Siyah Fosfor Kuantum Noktaları
BTB: Boran tert-butilamin
Cu: Bakır
Kob: Koloni Oluşturan Birim
DNA: Deoksiribo Nükleik Asit
DNTB: Ditiobis (2-nitrobenzoik asit)
EPS: Ekzopolisakkarit
GO: Grafen oksit
GSH: Glutatyon
H_2O_2: Hidrojen peroksit
ICP-MS: Endüktif olarak eşleşmiş plazma kütle spektrometresi
IgG: İmmünoglobülin G
MHA: Mueller-Hinton Agar
MoS_2: Molibden disülfür
MRSA: Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*
MSSA: Metisiline Duyarlı *Staphylococcus aureus*
NaCl: Sodyum klorür
NIR: Yakın kızıl-ötesi
OAc: Oleik asit

OAm: Oleylamin ($C_{18}H_{37}N$)
OD: Optik Yoğunluk
ODE: 1- Oktadesen ($CH_3(CH_2)_{15}CH=CH_2$)
·OH: Hidroksil radikali
PDA: Polidopamin
PEG: Polietilen Glikol
RNA: Ribo Nükleik Asit
ROS: Reaktif Oksijen Türleri
SEM: Taramalı Elektron Mikroskopisi
SI: Uluslararası Birimler Sistemi
Sn: Kalay
SnI_4: Kalay (IV) iyodür (Stannik iyodür)
TEM: Geçirimli Elektron Mikroskopisi
TRES: Zamana Bağlı Emisyon Spektroskopisi
TSB: Tryptic Soy Broth
UV: Ultraviyole
UV-Vis-NIR: Ultraviyole-Görünür-Kızılötesi
XRD: X-Işınları Kırınımı

1. GİRİŞ

Günümüzde nanomalzemeler sahip oldukları farklı fiziksel ve kimyasal özellikler sayesinde özellikle biyoteknoloji, tıp ve biyomedikal gibi alanlarda yoğun bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Nanoteknolojinin (nanomalzemelerin yüksek hacim/yüzey oranına sahip olmaları, içsel optik, manyetik ve toksik olmayan özelliklerinden faydalanılarak) biyoteknoloji bilimi ile bir araya getirilmesi sayesinde çeşitli biyomedikal problemlere çözüm bulunarak sağlık ve tıp alanlarında devrim yaratılabilir. Son yıllarda iki boyutlu eşsiz yapılarıyla ilgi uyandıran altıgen bor nitrür, geçiş metal dikalkojenitler ve grafen gibi malzemelerin kanser tedavisi, ilaç salınımı, biyosensör ve biyogörüntüleme gibi çeşitli alanlarda kullanılması bilim insanlarını yeni nesil nanohibrit malzemeleri keşfetmeye teşvik etmiştir.

Yeni nesil nanomalzemelerin bir üyesi olan siyah fosfor sahip olduğu eşsiz bal peteği görünümündeki yapısı, fotokatalitik ve optoelektronik özellikleri sayesinde bilim dünyasında oldukça dikkat çekmiştir. Yapısındaki fosfor elementi sayesinde siyah fosfor canlı hücrelerle yüksek derecede biyouyumluluk göstermektedir (Shao ve ark., 2016). Siyah fosfor, insan vücuduna girdiğinde sorunsuz bir şekilde fosfat, fosfit ve diğer fosfor oksitlere ayrışabildiği için biyobozunur bir malzemedir. Bu özelliği sayesinde biyolojik uygulamalarda kullanıma elverişlidir (Choi ve ark., 2018b)

Son yıllarda, antibiyotiklere dirençli bakterilerden kaynaklanan enfeksiyon hastalıkları insan sağlığına yönelik ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Özellikle *Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus* ve Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) gibi hem enfeksiyona sebep olup hem de medikal cihazlar ve farklı yüzeyler üzerinde güçlü biyofilm yapıları oluşturan patojen bakterilere karşı geleneksel antibiyotik tedavisi ve dezenfeksiyon işlemleri yetersiz kaldığı için yeni nesil antibakteriyel ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır (Van Houdt ve Michiels, 2005; Guiton ve ark., 2010a; Kırmusaoğlu ve ark., 2017). Bu kapsamda iki boyutlu nanomalzemeler benzersiz katmanlı yapıları, yüksek yüzey/hacim oranları gibi özelliklerinden dolayı umut vericidir.

Siyah fosfor katmanlı yapısı, elektronik özellikleri, biyouyumlu ve biyobozunur doğası dışında 780-2500 nm dalga boyu aralığındaki ışığa duyarlı yapısı sayesinde fototermal terapi uygulamalarında da kullanılmaktadır (Wang ve ark., 2015; Chen ve ark., 2017b; Yang ve ark., 2017b). Yapılan literatür araştırmalarında, siyah fosforun yakın kızılötesi bölge (NIR) ışığı altında oldukça aktif bir antibakteriyel etkiye sahip

olduğu ve aynı zamanda farklı nanoparçacıklar ile oluşturulan nanohibrit yapıların yalın haldeki siyah fosfora göre daha etkili bir fototermal etki gösterdiği ortaya konmuştur (Ouyang ve ark., 2018b; Wu ve ark., 2018). Buna dayanarak, bu tez çalışmasında, siyah fosfor tabanlı yeni nesil nanohibrit malzemelerin NIR ışığı altında, insan sağlığını tehdit eden *E.coli, E. faecalis, S. aureus* ve MRSA bakterileri üzerindeki antibakteriyel ve antibiyofilm aktiviteleri araştırılmıştır.

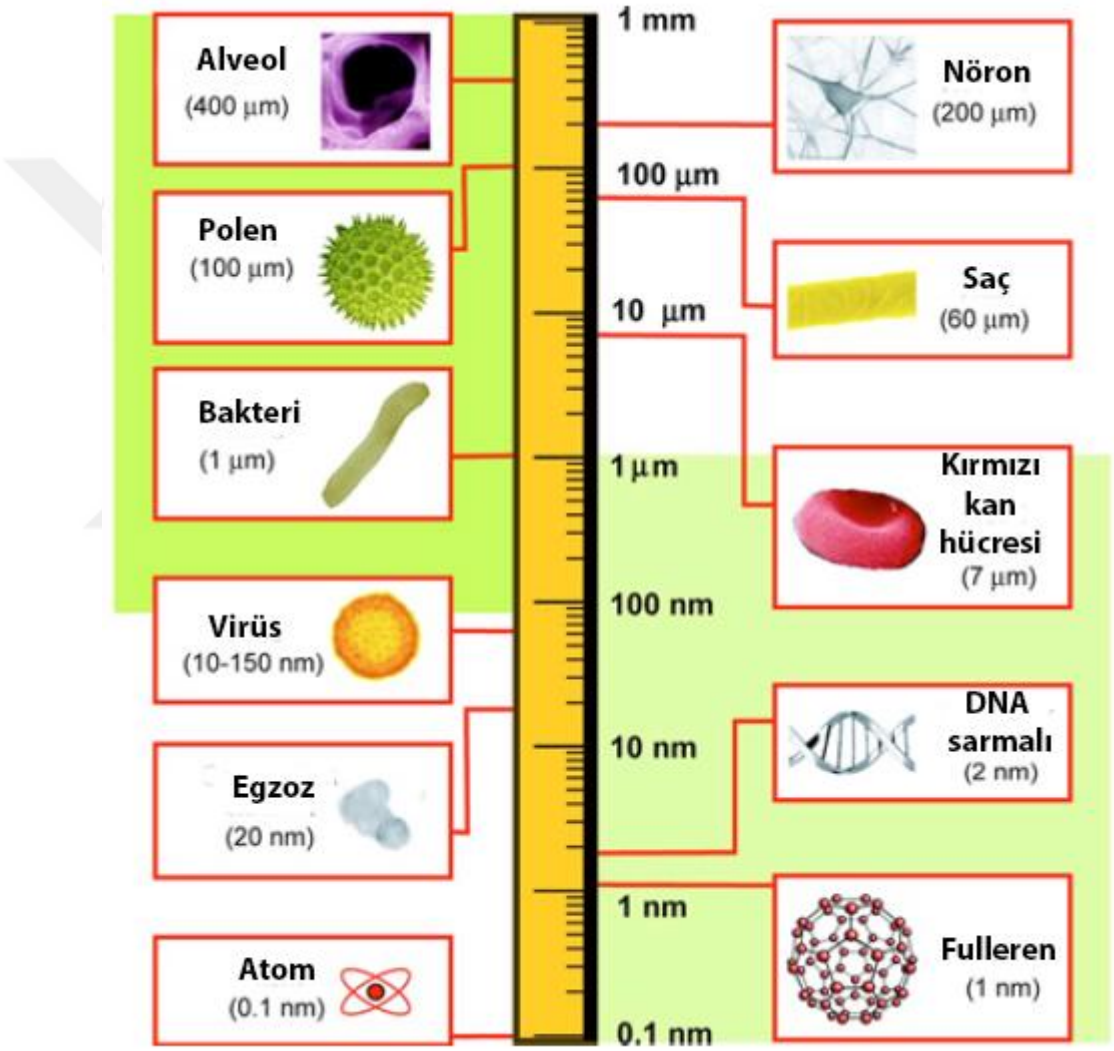
1.1 Nanomalzemeler

Uluslararası birimler sistemi (SI) ön eki olan "nano" sözcüğü Yunan dilinde cüce manasına gelen "nanos" sözcüğünden türetilmiştir (Buzea ve ark., 2007). Nanoteknoloji ile nano boyutta yeni malzemeler üretip bu malzemeler ile nano ölçekli manipülasyonlar yapma fikri çok uzun yıllardır ortada olmasına rağmen bu kavramın doğuşu 20. Yüzyılın ortalarını bulmuştur (Buzea ve ark., 2007).

Nanomalzemeler, kontrol edilebilir şekilde sentezlenen oldukça küçük boyutlu (1-100 nanometre arasında) yapılardır (Buzea ve ark., 2007). Bir nanometre (nm) metrenin milyarda birine (10^{-9} metre) tekabül etmektedir. Nanomalzemeler sahip oldukları moleküler yapı, boyut ve şekillerine göre sınıflandırılmaktadır. Nanomalzemelerin moleküler yapıları incelendiğinde, atomların son yörüngesinde yer alan serbest elektronların serbestlik derecesinin nanomalzeme boyutu üzerinde etkili olduğu görülmektedir (Tüylek, 2016). Bu serbest elektronların hareket kabiliyetine göre nanomalzemelerin boyutları ve dolayısıyla yapıları değişime uğramaktadır (Baykara ve ark., 2010). Son yörüngedeki serbest elektronlar eksenel olarak 3 yönlü hareket yeteneğine sahip olduğunda üç boyutlu yapılar (elmas, grafit vb.) elde edilmektedir. Serbest elektronlar eksenel olarak 2 yönde hareket yeteneğine sahip ise iki boyutlu malzemeler (bor nitrür, molibden disülfür, grafen vb.) elde edilirken; tek yönde hareket etme özelliği varsa bir boyutlu (nanotel, nanotüp vb.) malzemeler oluşturulmaktadır. Serbest elektronların eksenel olarak hareket edebilme kabiliyetleri sınırlandırıldığında ise sıfır boyutlu nanoyapılar (kuantum noktalar, nanoküreler, fullerenler vb.) elde edilmektedir (Baykara ve ark., 2010).

Yapay olarak sentezlenen nanomalzemeler dışında, canlı vücudunda da nano ve mikro boyutlu yapılar bulunmaktadır. Bakteri ve sinir hücreleri gibi mikro boyutlu yapıların yanında virüs, kırmızı kan hücreleri gibi nano boyutlu yapılar da vardır (Şekil 1.1). İnsan hücrelerinde bulunan hücre zarının kalınlığı nanometre boyutundadır. Bunun

yanı sıra hücrenin genetik materyalini oluşturan DNA ve RNA moleküllerinin çapı, ribozom ve mitokondri gibi organeller de hücre içerisinde nanometre boyutunda bulunmaktadır (Tüylek, 2016). Canlı hücrelerde bulunan doğal nanoyapılar sorunsuz bir şekilde çalışırken; yapay olarak üretilen nanomalzemelerin manipülasyonu oldukça zordur. Günümüzde malzeme bilimi ve nanoteknoloji bilim dalı sayesinde bilim insanları nanomalzemelerin bu kararsız yapılarını modifiye etmek için çeşitli yöntemler geliştirerek yapay olarak üretilen nanoyapıların işlevselliğini ve kullanım alanlarını arttırmaya çabalamaktadırlar.



Şekil 1.1 Biyolojik bileşenler ve nanomalzemelerin büyüklüğünü gösteren uzunluk ölçeği (Buzea ve ark., 2007)

1.1.1. Yeni Nesil Nanomalzemeler: Siyah Fosfor

Son yıllarda daha çok değer kazanan yeni nesil nanomalzemeler ultra ince 2 boyutlu yapıları ve yüksek yüzey/hacim oranları sayesinde güçlü mekanik ve optik

özelliklere sahiptir (Ouyang ve ark., 2018b). Özellikle 2 boyutlu yarı iletken malzemeler başta elektrik ve optik cihazların yapımı olmak üzere birçok farklı alanda kullanılmaya başlanmıştır. Grafen ve geçiş metal dikalkojenitler bu alanda en fazla çalışılan malzemelerdendir. Grafenin bant aralığının sıfır olması ve metal dikalkojenit malzemelerin yük taşıyıcı hareketliliğinin düşük olması sebebiyle özellikle biyomedikal uygulamalarda yetersiz kaldığı gözlenmiştir. Bu nedenle, bunlara alternatif ve daha üstün bir malzeme olduğu ispatlanan siyah fosfor kullanılmaya başlanmıştır. Bu tez çalışmasında, 2 boyutlu yarı iletken ailesinin en güçlü üyesi olarak gösterilen siyah fosfor malzemesinin antibakteriyel alanda kullanımı için bir strateji geliştirilmiştir.

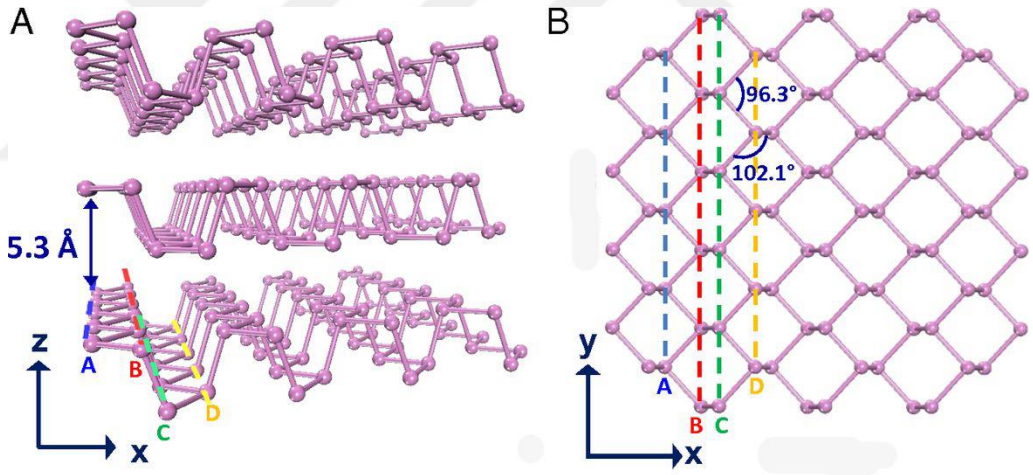
Fosfor elementinin doğada üç allotrobu vardır; beyaz fosfor, kırmızı fosfor ve siyah fosfor. Bunların içinde en kararlı olan siyah fosfor ilk olarak 1914 yılında Bridgman tarafından beyaz fosforun 200 °C sıcaklıkta, yüksek basınç altında kırmızı fosfora dönüştürülmesi sırasında keşfedilmiştir (Ling ve ark., 2015). Bridgman bu başarısıyla 1946 yılında Nobel ödülüne layık görülmüştür. Siyah fosfor ilk sentezlendiğinde yapısı ve tüm özellikleri aydınlatılmadığından yarı iletken çalışan araştırma grupları tarafından fazla ilgi görmemiştir.

Yığın halde bulunan malzemelerin mekanik tabakalarına ayırma yöntemiyle az veya tek katmanlı 2 boyutlu yapılara dönüştürülebildiği kanıtlandıktan sonra ise siyah fosfora olan ilgi artmıştır. Bu yöntemle elde edilen siyah fosfor 2 boyutlu nanomalzeme ailesinin diğer üyelerinde olmayan pek çok eşsiz özelliğe sahiptir (Ling ve ark., 2015). 2014 yılına kadar grafen mekanik tabakalarına ayırma metoduyla üretilen tek kararlı 2 boyutlu malzeme iken; son yıllarda yapılan çalışmalar siyah fosforun da grafen ile aynı yöntem kullanılarak tabakalarına ayrıştırılabildiğini göstermiştir (Tran ve ark.; Castellanos-Gomez ve ark., 2014; Qiao ve ark., 2014a). Siyah fosfor, 2014 yılında 2 boyutlu nanomalzemelerin yeni ve güçlü bir üyesi olarak gösterilmiştir (Bridgman, 1914; Li ve ark., 2014a; Ling ve ark., 2015). Katman yapısının benzersizliği, buna bağlı ayarlanabilir direkt bant aralığı, güçlü fotokatalitik, anizotropik ve optoelektronik özellikleri siyah fosforu özellikle biyoteknoloji ve biyomedikal alanlarında ilgi odağı haline getirmiştir (Qian ve ark., 2017; Ouyang ve ark., 2018b; Li ve ark., 2019a). İnsan vücudunun %1'ini fosfor (P) elementinin oluşturmasından dolayı siyah fosfor, biyobozunur ve biyouyumlu bir malzeme olarak karşımıza çıkmaktadır (Choi ve ark., 2018a). Bunlara ek olarak siyah fosforun farklı nanomalzemeler ile birleştirilmesiyle oluşan hibrit yapılar optoelektronik, fotokatalitik ve biyomedikal alanlarda

gerçekleştirilecek olan çalışmalar için umut vaad etmektedir (Deng ve ark., 2014; Guo ve ark., 2014).

1.1.1.1 Siyah Fosforun Yapısal Özellikleri

Siyah fosfor yapısındaki her bir fosfor atomunun bitişiğindeki üç fosfor atomuna kovalent bağ ile bağlanmasıyla oluşan bir bal peteği görünümüne sahiptir (Şekil 1.2). Tek veya çok az tabakalı siyah fosfor "fosforen" olarak adlandırılmaktadır (Du ve ark., 2015). Tek katmanlı siyah fosfor iki tip fosfat (P-P) bağı ve 2 atomik tabakadan oluşmaktadır. Bu fosfat bağlarından biri kısa diğeri uzundur. Aynı düzlemdeki en yakın P atomlarını birbirine bağlayan bağ kısa bağ (0.2224 nm); tek bir tabakanın üstündeki ve altındaki P atomlarını birbirine bağlayan bağ ise uzun bağ (0.2244 nm) olarak tanımlanır. Siyah fosfor Şekil 1.2'de gösterildiği gibi üstten 96.3^0 ve 102.1^0'lik bağ açılı altıgen bir yapıya sahiptir (Takao ve ark., 1981; Asahina ve ark., 1982).



Şekil 1.2. (A) Siyah fosfor molekülünün yandan görünümü. Katmanlar arası boşluk 0.53 nanometredir. (B) Tek katmanlı siyah fosforun üstten görünümü (Ling ve ark., 2015)

Tek katmanlı siyah fosfor yüksek yük taşıyıcı hareketliliğe sahiptir (Qiao ve ark., 2014b). Siyah fosforun sahip olduğu bant aralığı, kalınlığının yanı sıra yüksek sıcaklık ve basınçtaki sıkıştırılmasına bağlı olarak da değişebilmektedir (Li ve ark., 2014c; Rodin ve ark., 2014). Ayrıca siyah fosfor sahip olduğu anizotropik bal peteği yapısı sayesinde negatif Poisson oranına sahiptir. Oluşan yanal gerilimi uygulanan eksenel gerilim ile ilişkilendiren temel bir mekanik özellik olan Poisson oranı neredeyse bütün malzemelerde pozitiftir. Poisson oranının pozitif olması malzeme uzunlamasına gerildiğinde yanal yönlerde kısalması anlamına gelmektedir. Bu sebeple bu oranın

negatif olması, istenen fakat genel olarak zor bulunan bir özelliktir. Bu bağlamda siyah fosfor bu özelliğinden dolayı oldukça dikkat çeken bir malzemedir (Jiang ve Park, 2014).

Siyah fosfor, katman sayısı değiştirilerek ve gerilim uygulanarak bant aralığının ayarlanabilmesi sayesinde özellikle optoelektronik uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Rodin ve ark., 2014). Siyah fosforun bant genişliği 0.3 eV'tan (yığın halde) 2.0 eV'a (tek katmanlı halde) kadar çıkabildiği kanıtlanmıştır (Asahina ve Morita, 1984; Rodin ve ark., 2014).

1.1.1.2. Siyah Fosforun Uygulama Alanları

Siyah fosfor ayarlanabilir bant aralığı ve anizotropik özellikleri sayesinde özellikle alan etkili transistörler, fotodedektörler, pillerdeki katot/anot malzemeleri, termoelektrik vb. uygulamalarda kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra, canlı vücudunda kolay bir şekilde bozunabildiğinden biyosensör, biyogörüntüleme, kanser tedavisi, fototermal terapi ve ilaç salınımı gibi farklı birçok biyolojik uygulama için de elverişlidir ve hali hazırda kullanılmaktadır.

Son olarak, siyah fosforun yalın halde ve çeşitli nanoparçacıklar ile birleştirilmesiyle edilen hibrit formları kullanılarak yapılan antibakteriyel aktivite çalışmaları da mevcuttur.

Bu tez çalışmasında siyah fosfor altın ve gümüş nanoparçacıklar ile birleştirilerek nanohibrit malzemeler elde edildiğinden aşağıda kısaca altın ve gümüş nanoparçacıklar hakkında bilgi verilecektir.

1.1.2. Altın ve Gümüş Nanoparçacıklar

Nanoparçacıklar, iki veya üç boyutta 1 ila 100 nm arasında değişen uzunluklara sahip olan ayrık parçacıklar olarak ifade edilir (ASTM, 2006; Zhou ve ark., 2009). Nanoparçacıklar, hazırlama şartlarına ve etrafına katkılanan malzemelere bağlı olarak suda (hidrosol) veya organik çözücülerde (organosol) dağılabilme özelliğine sahiptir (Zhou ve ark., 2009). Nanoparçacıklar genel olarak, yarı iletken kuantum noktalar, manyetik nanoparçacıklar, polimerik parçacıklar, karbon bazlı nanoyapılar ve metalik nanoparçacıklar olarak beş farklı grupta toplanırlar (Huang ve ark., 2007b).

Geçtiğimiz yıllarda, nanoparçacıklar, belirgin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklere sahip olması ve nano ölçekli boyutları sebebiyle büyük ilgi uyandırmıştır (Bhattacharya ve Mukherjee, 2008). Nanotektonolojide kuantum boyut etkisinden dolayı malzemelerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik aktiviteleri malzemenin hem yığın hem de iyonik halinden oldukça farklı özellikler göstermektedir (Morones ve ark., 2005; Bhattacharya ve Mukherjee, 2008). Örneğin, metalik altın; sarı renkteyken, altın nanoparçacıkları; şarap kırmızısı rengindedir ve nanoparçacıkların renkleri büyüklük ve şekillerine göre değiştirilebilmektedir (Bhattacharya ve Mukherjee, 2008).

Günümüzde metalik nanoparçacıklar (özellikle altın ve gümüş) biyolojik sistemlere uygunlukları ve sentez kolaylığı sebebiyle biyoteknoloji ve biyomedikal alanlarında ilaç salınımı, fototermal terapi ve antibakteriyel aktivite çalışmalarında tercih edilmektedir (Morones ve ark., 2005; Austin ve ark., 2014; Zhu ve ark., 2014; Yin ve ark., 2018).

Altın nanoparçacıklar (Au NP) genel olarak insan hücreleriyle muhteşem biyouyumluluk, kolay sentezlenebilme, çeşitli moleküllerle kolay konjuge olabilme, küçük boyut ve yüksek yüzey/hacim oranı gibi özellikleri sayesinde özellikle biyomedikal uygulamalar için diğer inorganik nanoparçacıklara kıyasla daha çok tercih edilmektedir (Huang ve ark., 2007b). Au NP'lar tepkimeye giren maddelerin konsantrasyonları, tepkime koşulları ve çözücülerin değiştirilmesiyle farklı şekil ve boyutlarda sentezlenebilmektedir (Gole ve Murphy, 2004; Eustis ve El-Sayed, 2006; Xu ve ark., 2007).

Son yıllarda metal nanoparçacıklar özellikle patojenik bakterilerle mücadelede önemli bir antibakteriyel ajan olarak kullanılmaktadır (Morones ve ark., 2005; Hyland ve ark., 2006). Oldukça basit bir sentez yöntemi, üstün fotofiziksel kabiliyeti ve biyobozunur özellikleri sayesinde Au NP'lar çeşitli biyolojik alanlara uygulanmıştır (Zhu ve ark., 2014). Au NP'lar özellikle gen terapisi, biyosensör, kanser tedavisi ve antibakteriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Gümüş nanoparçacıklar (Ag NP) yüksek elektriksel ve termal iletkenlik, kimyasal kararlılık ve katalitik aktivite gibi belirgin fizikokimyasal özelliklere sahiptir (Krutyakov ve ark., 2008). Bunlar dışında Ag NP'lar özellikle patojen bakterilere karşı etkili bir antibakteriyel ajan olarak gösterilmiştir (Marambio-Jones ve Hoek, 2010). Ayrıca yapılan çalışmalarda Ag NP'ların canlı vücudu ile biyouyumlu bir yapı göstermesi, bu malzemenin biyolojik alanlarda uygulanabilir olduğunu göstermektedir (Neibert ve ark., 2012; Pauksch ve ark., 2014; Ouyang ve ark., 2018b). Sahip olduğu bu

özellikler doğrultusunda Ag NP'lar kataliz, biyosensör, ilaç salınımı ve antibakteriyel tedavi gibi alanlarda kullanılmaktadır (Pozo, 2010).

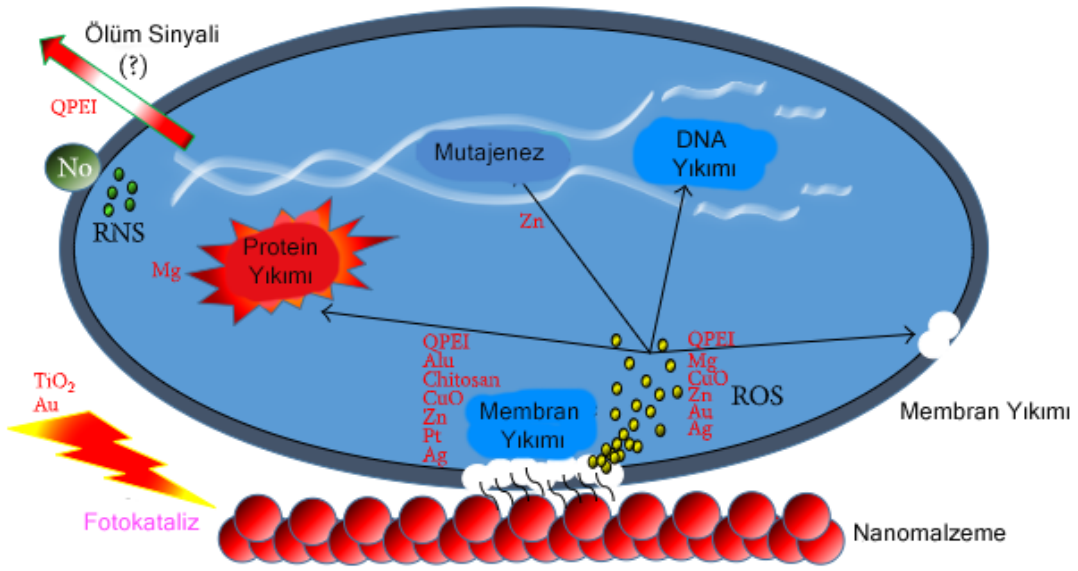
1.2. Nanomalzemelerin Antibakteriyel Etkisi

Yüzyıllardır antibiyotik ilaçlar bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde birincil çözüm yöntemi olarak bilinmektedir (Ouyang ve ark., 2018b). Ancak zaman içerisinde, antibiyotiklerin yanlış ve kötüye kullanımı sebebiyle mikroorganizmalar antibiyotiklere karşı çeşitli direnç mekanizmaları geliştirmişlerdir (Jansen ve ark., 2018). Antibiyotik ilaçlara karşı geliştirilen direnç mekanizması mikroorganizmalar arasında çeşitlilik gösterebilmektedir. Bakterilerin aynı antibiyotiğe karşı birden fazla direnç mekanizması geliştirmesi "çapraz direnç" olarak adlandırılırken; bir mikroorganizmanın etki mekanizması farklı birçok antibiyotiğe direnç geliştirmesi "çoklu ilaç dirençliliği" olarak adlandırılmaktadır (Kayiş, 2019). Bakteriler antibiyotiklere 3 ana mekanizma yoluyla direnç gösterir: (a) antibiyotiklerin imha edilerek veya modifikasyonlarla etkisiz hale getirilmesi, (b) antibiyotiğin hedef bölgeye erişiminin engellenmesi ve (c) antibiyotiğin etki edeceği hedef bölgenin değiştirilmesi (Neu, 1992). Antibiyotiklere en çok direnç gösteren mikroorganizmalar; *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Enterococcus spp., Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* olarak rapor edilmiştir (Erbay ve İdil, 2009; Keyik, 2013).

Günümüzde antibiyotiğe dirençli bakterilerin hızla ortaya çıkması bakteri hastalıklarının tedavisini zorlaştırmaktadır (Huang ve ark., 2009). Bu nedenle antibiyotiğe karşı direnç kazanmış bakterileri yok etmek için yeni nesil ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bağlamda, nanomalzemeler benzersiz fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde alternatif bir çözüm olarak umut vaad etmektedir (Pelgrift ve Friedman, 2013; Beyth ve ark., 2015; Gupta ve ark., 2016a). Son yıllarda nanoteknoloji, etkili antibakteriyel stratejilerin geliştirilmesi için önemli bir alan haline gelmiştir. Nanomalzemelerin yüzey alanlarının hacimlerine oranla daha büyük olması bakteriyel membranlar ile daha yakın etkileşime girmelerini sağlamaktadır (Hemeg, 2017). Ayrıca, nanomalzemeler çok az dozlarda yüksek antibakteriyel etki gösterebilmektedir (Beyth ve ark., 2015). Antibiyotik ilaçlar, bakteri hücre duvarı sentezi, DNA replikasyonu ve translasyon mekanizmasını hedef alırken; nanomalzemelerin bakterilere karşı gösterdiği etki oldukça farklıdır. Nanomalzemeler hücrelere doğrudan nüfuz etmeden direkt olarak hücre membranı ile temas kurduğu ve

hücredeki hiçbir mekanizmayla doğrudan etkileşime girmediği için bakterilerin direnç kazanabileceği bir durum oluşturmamaktadır (Beyth ve ark., 2015).

Antibakteriyel aktivite gösteren nanomalzemelerin kimyasal ve fiziksel yapıları oldukça çeşitlilik gösterdiğinden, etki mekanizmaları da birbirinden oldukça farklıdır. Şekil 1.3'te görüldüğü gibi nanomalzemeler bakteriler üzerinde farklı etkilere yol açarak çeşitli antibakteriyel stratejiler oluşturabilmektedirler (Beyth ve ark., 2015). Nanomalzemeler bakteri membranı ile elektrostatik bir etkileşime girerek bakteri membranının tahribatına neden olabilmektedir. Özellikle son yıllarda 2 boyutlu yarı iletkenlerin (grafen, siyah fosfor vb.) "nanobıçak" etkisiyle bakteri membranlarını delerek bozdukları gösterilmiştir (Zou ve ark., 2016b; Ouyang ve ark., 2018b). Bunun yanında, nanomalzeme-membran etkileşimi sonucu üretilen serbest oksijen radikalleri (ROS); membran hasarı, protein yapısının bozulması ve DNA yıkımına sebep olabilmektedir. Ayrıca, ışığa duyarlı nanomalzemeler aracılığıyla fototermal dönüşüm sağlanarak bakterilerin zarar görmesi sağlanabilmektedir. Tüm bu etkileyici özellikleri düşünüldüğünde, özellikle biyobozunur ve biyouyumlu nanomalzemelerin bakteri enfeksiyonu tedavisinde antibiyotik direncinin üstesinden gelerek insan sağlığında devrim yaratabileceği düşünülmektedir.



Şekil 1.3. Nanomalzemelerin antibakteriyel etki mekanizmaları (Beyth ve ark., 2015)

1.2.1. Fototermal Etki

Fototermal etki fotonların ışık ile uyarılması sonrasında termal enerji üretimi ile sonuçlanan bir süreçtir. Bazı malzemeler geniş bir frekans aralığındaki ışığı absorbe ederek termal enerjiye dönüştürebilmektedir. Fototermal terapi (PTT) ise; ışık ile ışınlandığında optik enerjiyi termal enerjiye dönüştüren bir ışık absorbe edici ajan kullanılarak açığa çıkan lokal hipertermi sayesinde bir hücrenin etkisiz hale getirilmesidir (Hamblin ve Avci, 2015). Fototermal dönüşüm sonucunda oluşan lokal hipertermi sayesinde özellikle, kanser/bakteri hücrelerinin gelişimi ve çeşitli yüzeylerdeki biyofilm oluşumunun engellenmesi sağlanabilmektedir (Shao ve ark., 2016; Xu ve ark., 2019b). Bundan dolayı, nanomalzeme bazlı fototermal ajanlar bakteri enfeksiyonlarının üstesinden gelmek için güvenilir ve etkili bir strateji olarak kabul edilmektedir (Xu ve ark., 2019b). Bununla birlikte, sağlıklı hücrelerin non-spesifik ısınmasının önlenmesi için fototermal ajanların hedef dokularda yüksek emilim ve seçici toplanma göstermesi gereklidir (Yang ve ark., 2014). Bu sebeple fototermal terapi çalışmalarında, fototermal dönüşümün en verimli olduğu yakın kızılötesi (NIR) ışık tercih edilmektedir (Jaque ve ark., 2014). 700-1400 nm dalga boyları aralığındaki NIR ışığı organizmaya herhangi bir zarar vermeksizin canlı dokulara derinlemesine nüfuz eder (Ouyang ve ark., 2018b). Bu nedenle NIR ışığının nanomalzemelerle birlikte kullanılması özellikle kanser ve enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde başvurulan etkili yollardan biridir.

Fototermal nanomalzemeler grafen türevleri, karbon nanotüpler, altın ve gümüş gibi metal nanoparçacıklar, molibden sülfür gibi 2 boyutlu yapılar olarak dört sınıfa ayrılmaktadır. Ancak bu gruplar fototermal ve antibakteriyel etkinin arttırılması adına bir araya getirilip hibrit yapılar da oluşturulabilmektedir (Xu ve ark., 2019a).

Siyah fosfor enerji spektrumunda geniş bir bölgeyi absorbe edebilmesi sayesinde güçlü bir fototermal etkiye sahiptir (Chen ve ark., 2017a; Fu ve ark., 2017). Siyah fosfor nanotabakaları özellikle NIR ışığı etkisinde yüksek performansla optik enerjiyi termal enerjiye dönüştürerek kanser tedavisinde alternatif bir yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır (Yang ve ark., 2017a). Bunda kanser hücrelerinin ısıya karşı çok duyarlı olması da önemli bir faktördür. Siyah fosfor sahip olduğu fototermal etki sayesinde yalnızca kanser tedavisinde değil; ilaç salınımı (Shao ve ark., 2016) ve antibakteriyel aktivite çalışmalarında (Ouyang ve ark., 2018a) da kullanılmıştır.

Fototermal dönüşüm metalik nanoparçacıklarda (altın, gümüş vb.) yüzey plazmonik rezonans olarak adlandırılmaktadır (Zhao ve ark., 2019). Önceki çalışmalar altın nanoparçacıkların lazer ışık ışınlanması ile fototermal hücre lizizi yaparak çeşitli bakteri türlerinin canlılığını önemli ölçüde azalttığını göstermektedir (Zharov ve ark., 2006; Huang ve ark., 2007a; Kim ve ark., 2007; Norman ve ark., 2008; Kim ve ark., 2009; Wang ve ark., 2010). Bunun yanında gümüş nanoparçacıkların NIR ışığı etkisinde fototermal dönüşüm sağlayarak kanser hücrelerini öldürebildiği bilinmektedir (Boca ve ark., 2011).

Siyah fosfor nanotabakaları ile altın ve gümüş nanoparçacıkların bir araya getirilerek hibrit yapılar oluşturulmasıyla fototermal dönüşüm verimliliklerinin artacağı öngörülmektedir. Bu nedenle bu çalışmada siyah fosforun ve Au/Ag NP'ları ile oluşturulan hibrit yapılarının (BP/Au ve BP/Ag) NIR ışık etkisi altındaki sıcaklık değişimleri ölçülmüştür.

1.2.2. Oksidatif Stres (Reaktif Oksijen Türleri Oluşumu)

Nanomalzemelerin bakteriler üzerindeki bir diğer etkisi süperoksit anyonları, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturmasıdır. ROS, oldukça reaktif olan ve temel metabolik faaliyetler sırasında üretilen oksijen türüdür (Slavin ve ark., 2017b). Normal şartlarda hücre içi savunma mekanizmaları, DNA, RNA ve protein gibi temel moleküllere zarar vermemek için istenmeyen bu radikallerle savaşmaktadır. Fakat, yüksek stres altında hücre içi ROS seviyesi önemli derecede artarak bakteriyel büyümeyi engellemektedir. ROS'lar bakterilerdeki DNA replikasyonunu, aminoasit sentezini ve oksidatif fosforilasyon reaksiyonlarını inhibe ederek hücreleri ölüme götürebilmektedir (Hemeg, 2017). ROS oluşumunun hücre metabolizmasına zarar vermesinin dışında bakteri hücre zarının tahribatına da yol açtığı bilinmektedir (Wang ve ark., 2014).

Bakterilerin hücre duvarı yapılarına göre Gram-pozitif ve Gram- negatif olarak 2 sınıfa ayrıldığı bilinmektedir. Gram-pozitif bakteriler hücre duvarlarında kalın bir peptidoglikan tabakası içerirken; Gram-negatif bakteriler lipopolisakkaritten oluşan ek bir dış zar ile ince bir peptidoglikan tabakasına sahiptir. Hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakteriler, negatif yüklü bir hücre duvarına sahiptir. Bakteri hücrelerinin bu özellikleri pozitif yüklü metal nanoparçacıklarla daha kolay etkileşmelerine sebep olmaktadır. Bakteri hücresine adsorbe olan metal nanoparçacıkların ise hücre duvarında

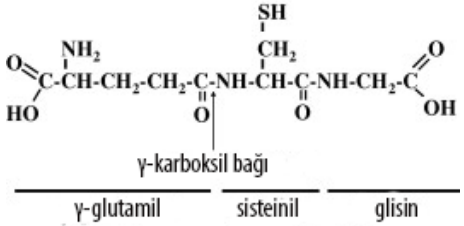
ROS oluşturarak mikroorganizmaya zarar verdiği görülmüştür. Metal nanoparçacıkların antibakteriyel aktiviteleri özellikle ROS üretme kabiliyetleri ve tiyol (-SH) gruplarıyla yakın ilişki kurmasına bağlanmaktadır (Slavin ve ark., 2017a).

ROS, oksijen istenmeyen indirgenme durumlarına girdiğinde ve su yerine serbest radikallere, süperoksit ve peroksitlere dönüştüğünde üretilir. Yapılan çalışmalarda özellikle nanoparçacıkların konsantrasyonları arttıkça serbest radikallerde artış olduğu gözlenmiştir (Slavin ve ark., 2017b).

Genellikle Ag NP'larının hidroksil radikali (·OH) ortaya çıkardığı gözlenirken (Łysakowska ve ark., 2015; Dakal ve ark., 2016; Durán ve ark., 2016), çinko oksit (ZnO) NP'larının hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturduğu bilinmektedir (Sirelkhatim ve ark., 2015). Bunların dışında grafen oksit (GO) ve titanyum dioksit (TiO_2) gibi nanomalzemeler ise özellikle NIR ışığı etkisinde fotokataliz yoluyla ·OH, H_2O_2 gibi radikalleri oluşturabilmektedir (Wong ve ark., 2015) (He ve ark., 2017). 2018 yılında siyah fosforun *E. coli* ve *B. subtilis* bakterileri üzerindeki toksik etkisi üzerine yapılan bir çalışmada ise siyah fosforun antibakteriyel etkisinde ROS üretiminin büyük bir etkisi olduğu belirtilmiştir (Xiong, 2018). Bu tez çalışmasında ise Glutatyon tükenme deneyi yapılarak sentezlenen BP, BP-Au ve BP-Ag nanomalzemelerinin antibakteriyel etkisinde rol alan oksidatif stres mekanizması araştırılmıştır.

1.2.2.1. Glutatyon (GSH)

Glutatyon (L-γ-glutamil-L-sisteinil-glisin) mikroorganizmadan insana kadar birçok hücrede antioksidan görevi gören tripeptit yapıdaki bir tiyoldür (Fahey ve ark., 1978; Fahey ve Sundquist, 1991). Glutatyonun bakterilerdeki fizyolojik konsantrasyonu 0.1 ila 10 mM arasında değişir (Meister, 1988). Şekil 1.4'te görüldüğü üzere yapısında bulunan iki karboksil, bir amin ve bir tiyol grubu nedeniyle GSH, sulu çözeltiler ve polar çözücülerde yüksek oranda çözünebilmektedir (Masip ve ark., 2006).



Şekil 1.4. Glutatyonun kimyasal yapısı (Lu, 2009)

GSH, mitokondri ve kloroplastı olmayanlar hariç neredeyse tüm ökaryotlarda, siyanobakteriler ve proteobakterilerin yanı sıra bazı Gram-pozitif bakterilerde de bulunmaktadır (Kadokura, 2006). Glutatyon içermeyen bazı prokaryotların ise glutatyona benzer şekilde işlev gören farklı düşük moleküler ağırlıklı tiyoller ürettiği bilinmektedir. GSH hücrelerde doğrudan ya da dolaylı olarak ROS'ların temizlenmesini sağlayarak hücre içi bir savunma mekanizması oluşturmaktadır (Kadokura, 2006; Biswas ve Rahman, 2009).

Glutatyon hücrelerde, okside glutatyon (GSSG) ve indirgenmiş glutatyon (GSH) olarak iki farklı yapıda denge halinde bulunur. Hücre içi GSH, GSH peroksidaz enzimi tarafından GSSG'ye dönüştürülmektedir. Hücrede bulunan toplam GSH'ın çoğu indirgenmiş halde bulunur; yalnızca %5'inden daha azı okside formundadır. Hücre içi GSH miktarı bazı durumlarda değişebilmektedir. Glutatyon hücrede ·OH gibi serbest radikallerle tepkimeye girerek bir tiyol radikali (·GS) açığa çıkarır. Oluşan tiyol radikali ile glutatyonun tepkimesi sonucunda GSSG radikali moleküler oksijen (O_2) ile tepkimeye girerek $O^{\cdot}{}_2^-$ oluşturmaktadır. Tüm bu tepkimelerin amacı ROS'ları indirgeyerek hücre için zararsız olan ve kolaylıkla metabolize edilen ürünler elde etmektir. Dolayısıyla hücre bazal metabolizmasında iken GSH seviyesi maksimum iken; oksidatif stres oluştuğunda GSH seviyesi azalmaktadır (Chai ve ark., 1994; Pastore ve ark., 2003).

Reaktif oksijen türleri ve oksidatif stres çalışmalarında hücrelerdeki GSH oranları takip edilir. Nanomalzemelerin antibakteriyel aktivitesine dair yapılan çalışmalarda etki mekanizmasının anlaşılması için hücrelerdeki GSH seviyeleri ölçülerek GSH tükenme oranları bulunmuştur (Ouyang ve ark., 2018a). Bu tez çalışmasında da GSH tükenme deneyi yapılarak sentezlenen BP, BP-Au ve BP-Ag nanomalzemelerinin antibakteriyel etkisinde rol alan oksidatif stres mekanizması incelenmiştir.

1.2.3. Nanobıçak Etki ve Membran Hasarı

Nanomalzemeler yapıları gereği keskin kenarlara sahiptir. Özellikle 2 boyutlu yarı iletken malzemeler sahip oldukları bu keskin kenarlar sayesinde bakteriler ile fiziksel temasa girerek bakteri zarını parçalayabilmektedir (Zou ve ark., 2016a). Sahip oldukları bu etki nanobıçak etkisi olarak adlandırılmaktadır. Nanomalzemeler bu yol ile membran bütünlüğünü bozarak bakterilerin ölümüne sebebiyet vermektedir.

Nanomalzemeler ile bakteri hücreleri arasında gerçekleşen fiziksel temas bakteri membranında ROS-bağımlı veya ROS-bağımsız oksidatif strese neden olabilmektedir (Zhang ve ark., 2010). Bakterilerin nanobıçak etkisi ile öldürülme mekanizması üç temel aşamadan oluşur: 1) nanomalzeme ve bakterinin bağlanması; 2) membranın bozulması; 3) hücresel yapı ve bileşenlerin inaktive edilmesi (Miao ve ark., 2019a). Yapılan çalışmalar, 2 boyutlu yarı iletken olan grafenin bakteriyel hücre zarını delip geçerek zarın fiziksel olarak bozulmasına, hücre içindeki maddelerin dışarı sızmasına ve sonuç olarak hücre ölümüne yol açtığı gözlemlenmiştir (Akhavan ve Ghaderi, 2010; Zou ve ark., 2016b). Bir başka çalışmada, GO nanotabakalarının ışık etkisinde oluşturduğu ROS'ların bakteri hücre zarında ciddi hasara yol açtığı rapor edilmiştir (Zou ve ark., 2017). Grafen ve GO nanotabakalarının antibakteriyel aktivitesinde bu malzemelerin boyutu ve yüzey özellikleri belirleyici faktörlerdir. Boyutları küçüldükçe ve yüzey pürüzlükleri arttıkça bakteri hücreleri ile daha çok etkileşime girerek antibakteriyel yetenekleri artabilmektedir. Ayrıca bir başka 2 boyutlu nanomalzeme olan Molibden disülfür (MoS_2)'ün keskin kenarları ve güçlü oksidasyon özellikleri sayesinde bakteri hücreleriyle fiziksel temas kurarak membranlarına zarar verdiği bilinmektedir (Kim ve ark., 2017). Siyah fosfor yapısal ve fiziksel özellikleri bakımından grafen ve molibden disülfür gibi malzemelerle oldukça benzer bir yarı iletken olduğu için antibakteriyel mekanizmalarının benzer olabileceği varsayılmaktadır. Yapılan çalışmalarda siyah fosforun bakteri hücreleriyle temas kurup membran bütünlüğünü bozduğu tespit edilmiştir (Xing,2018). 2 boyutlu nanomalzemelerin yanı sıra metal nanoparçacıkların bakteri membranına adsorbe olarak hücreye nüfuz ettiği ve buna bağlı membran hasarlarına neden olduğu bilinmektedir (Stoimenov ve ark., 2002; McQuillan ve ark., 2012). Nanoparçacıkların adsorpsiyonu hücre depolarizasyonuna sebep olarak membranın yapısını bozup geçirgenliğini artırarak bakterilerin ölümüne yol açmaktadır.

Bundan dolayı bu tez çalışmasında da BP, BP-Ag ve BP-Au malzemelerinin bakteri morfolojisine ve membranına olan etkisi floresan ve SEM mikroskopisi ile incelenmiştir.

1.3. Çalışmada Kullanılan Bakterilerin Karakteristik Özellikleri

1.3.1. *Escherichia coli*

Enterobacteriaceae familyasına ait olan *E. coli* bakterisi, memeli hayvanların kalın bağırsağını yaşam alanı edinmiş, Gram-negatif ve endospor oluşturmayan fakültatif anaerob bir bakteri türüdür. 0.5 µm eninde ve 2.0 µm boyunda çubuk şeklindeki bakterilerdir. *E. coli* bakteri çalışmalarında sıklıkla kullanılan ve hakkında en fazla şey bilinen bir model organizmadır.

E. coli bağırsak florasının normal bir üyesi olduğu için normal koşullarda hastalık oluşturmamasına rağmen, farklı bir organa geçerek veya konak organizmasını değiştirerek hastalık etmeni haline gelebilmektedir. Örneğin, hayvanlarda bulunan bazı *E. coli* tipleri hayvanda hastalık oluşturmazken insana bulaştığında hastalık oluşturabilmektedir. Bu hastalıklar başta ishal olmak üzere menenjit, zatürre, septisemi ve safra kesesi iltihabıdır. Bu tez çalışmasında *E.coli* model mikroorganizma olarak kullanılmıştır.

1.3.2. *Enterococcus faecalis*

Enterococcaceae familyasına ait olan *E. faecalis*, insan ve diğer memeli hayvanların gastrointestinal mikroflorasında yaşayan Gram-pozitif bir bakteridir. Genellikle hareketsiz, fakültatif anaerob ve kok şeklinde olan bu bakteriler toprak, su ve bitkilerde bulunabilmektedir.

E. faecalis normal şartlarda sağlıklı bireylerin bağırsaklarında yaşamasına rağmen yaşamı tehdit eden, hastane kökenli enfeksiyonlara sebep olabilmektedir. Bu enfeksiyonlar idrar yolu enfeksiyonları, yara enfeksiyonları, endokardit, bakteriyemi ve protez eklem enfeksiyonlarıdır (Goh ve ark., 2017). Bu enfeksiyonlar tedavi edilmedikleri takdirde ölümcül olabilmektedir. Ayrıca, *E. faecalis* penisilin, amfilisin, vankomisin ve aminoglikozit gibi çeşitli antibiyotiklere karşı direnç gösterdiği için tedavi edilmesi oldukça güç olan patojenik bir bakteridir (Paulsen ve ark., 2003). Bunların yanı sıra, *E. faecalis* bakterisinin idrar sondaları ve üreter stent gibi medikal cihazların üzerinde güçlü bir biyofilm tabakası oluşturduğu bilinmektedir (Stickler, 2008; Guiton ve ark., 2010b). Biyofilm oluşturması önemli virülans faktörlerden biridir. Antibiyotiklere karşı gösterdiği çoklu ilaç direnci ve medikal cihazların üzerinde

oluşturduğu güçlü biyofilm tabakaları sebebiyle bu bakterinin sebep olduğu enfeksiyonların tedavisi oldukça zordur.

1.3.3. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcaceae familyasının bir üyesi olan *S. aureus* üst solunum yollarında ve sağlıklı bireylerin cilt ve mukoza zarlarında yaşayan bir bakteridir. *S. aureus* Gram-pozitif kok şeklinde, 0.5-1.5 μm çap aralığına sahip bir bakteridir. Fakültatif anaerob olan *S. aureus*'un hareket etme ve spor oluşturma kabiliyeti bulunmamaktadır (Range ve Dose).

S. aureus insan mikroflorasında doğal olarak bulunan bir mikroorganizma olmasına rağmen bazı durumlarda fırsatçı bir patojen olabilmektedir. İnsanlarda sebep olduğu hastalıklar; bakteriyemi, endokardit, protez enfeksiyonları, akciğer enfeksiyonları, gastroenterit, menenjit ve idrar yolu enfeksiyonlarıdır (Tong ve ark., 2015). *S. aureus* oksasilin antibiyotiğine dirençli olup olmamasına göre Metisiline Duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA) ve Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) olarak iki gruba ayrılmaktadır.

S. aureus aynı zamanda, bir glikokaliks veya balçık içerisine gömülü olarak konakçı dokusunda veya medikal cihaz yüzeylerinde çok katmanlı biyofilm tabakaları oluşturarak kan dolaşımı enfeksiyonlarına neden olmaktadır (Jabra-Rizk ve ark., 2006). Biyofilm ortamındaki mikroorganizmalar antibiyotik ilaçlara karşı daha fazla direnç gösterdiği için, bu mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyonların tedavisi oldukça zorlaşmaktadır.

1.3.4. Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Metisilin antibiyotiği, penisiline direnç gösteren *S. aureus* suşlarının sebep olduğu enfeksiyonların tedavisi için geliştirilen bir antibiyotiktir (Enright ve ark., 2002). Ancak zamanla bu *S. aureus* suşları Metisiline direnç kazanarak MRSA adını almıştır.

Gram-pozitif bir bakteri olan MRSA, *S. aureus* suşları ile aynı karakteristik özelliklere sahipken, genetik olarak *S. aureus* suşlarından oldukça farklıdır. Metisiline dirençli *S. aureus* suşlarının en önemli ortak özelliklerinden biri kromozomlarında mecA gen bölgesini taşımalarıdır (Hiramatsu, 1995). Bu gen bölgesi düşük afiniteli penisilin bağlayıcı proteinin (PBP 2A) sentezinden sorumludur (Wielders ve ark.,

2002). MRSA suşlarının evrimsel kökenini açıklamak için ortaya atılan hipotezlerden biri mecA geninin yatay transferi hipotezidir. Bu hipoteze göre mecA geni *Staphylococcus epidermidis*'ten *S. aureus*'a aktarılarak bakteriler direnç kazanmaktadır (Fitzgerald ve ark., 2001). Bu nedenle MRSA suşları çoğu antibiyotik sınıflarına karşı direnç göstermesi sebebiyle savaşılması giderek zorlaşan hastane kaynaklı enfeksiyonların başlıca nedenidir. Bu tez çalışmasında aynı zamanda *E.coli, E. faecalis, S. aureus* ve MRSA bakterilerinin BP, BP/Au ve BP/Ag nanomalzemeleri kullanılarak antibiyofilm özellikleri incelenmiştir.

1.4. Biyofilm

Biyofilmler, hücre dışı bir matris yapısı içerisinde, canlı veya cansız yüzeylere yapışık olarak yaşayan bakteri topluluklarıdır. Genel olarak biyofilm yapıları polisakkarit, mikroorganizma, su, protein ve DNA'dan oluşmaktadır. Bu içeriklerin oranları biyofilmi oluşturan mikroorganizmaların çeşidine, fizyolojik özelliklerine ve yüzeyin fiziksel özelliklerine göre değişmektedir (Winfield ve ark., 2007).

Tüm biyofilmlerin ortak bileşeni olan ekzopolisakkarit (EPS) biyofilmin önemli bir kısmını oluşturmamasına rağmen biyofilmin iskeletini oluşturan ana yapısal madde olarak kabul edilmektedir. Bu yapı, mikroorganizmaların kararlı agragetlar oluşturmasını sağlayarak yüzeye tutunmasını kolaylaştırmaktadır.

Biyofilm tabakaları bakterilerin sıcaklık, pH ve nem değişikliklerine karşı direncini artırarak onları korumaktadır. Ayrıca biyofilm tabakasının içerisinde bulunan su ve besin kanalları sayesinde bakterilerin besin ihtiyacı karşılanmaktadır. Biyofilmi oluşturan bakterilerin büyüme hızları diğer bakterilere oranla daha yavaş olmasına rağmen; bu bakteriler antibiyotiklere karşı daha dirençlidir. Biyofilm oluşturan bakteriler arasındaki gen transferleri de oldukça hızlıdır (Carniol ve Gilmore, 2004). Bu hızlı gen transferi sayesinde bakteriler direnç genlerini kolayca birbirlerine aktarabilmektedir.

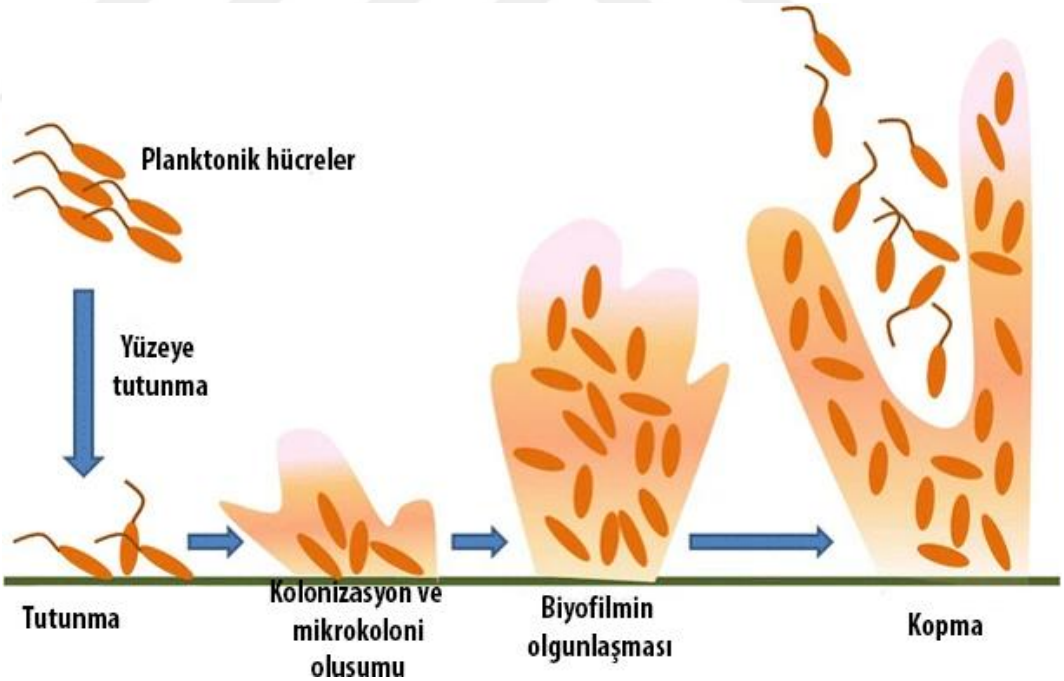
1.4.1. Biyofilm Oluşumu ve Önemi

Biyofilmler biyolojik veya biyolojik olmayan katı yüzeylerde oluşmaktadır. Vücuttaki mikrobiyal enfeksiyonların %80'inden fazlası biyofilm oluşumundan kaynaklanmaktadır (Cortés ve ark., 2011a).

Biyofilm oluşumu Şekil 1.5'te görüldüğü gibi, serbest halde bulunan planktonik mikroorganizmaların bir yüzeye tutunması, geri dönüşümsüz bağlanması, kolonizasyon ve mikrokoloni oluşumu, kopma evreleri olmak üzere dört aşamada gerçekleşmektedir.

Biyofilm yapısını oluşturan bakteriler EPS denilen matrise gömülüdür. Aynı zamanda 'glikokaliks' olarak adlandırılan bu matrisin içerisinde kompleks lipopolisakkaritler, glikolipitler, glikoproteinler ve biyofilmi bir arada tutan diğer bileşenler bulunmaktadır (Ma ve ark., 2006). Biyofilm içerisindeki bakteri hücreleri bir takım sinyal molekülleri aracılığıyla birbirleriyle iletişim kurabilmektedir. Bakterilerin birbirleriyle kurdukları bu iletişim 'quorum sensing' olarak adlandırılmaktadır (Davies ve ark., 1998).

Hem kalıcı hem de deri altında bulunan biyomedikal cihazlar mikroorganizmalar için hedef bölgelerdir. Mikrobiyal biyofilmler, medikal aletlerin yüzeylerinde (idrar yolu protezleri, membran ve periton diyaliz kateterleri, kalp pilleri, protez kalp kapakçıkları ve kalp implantları), diş tabakasında (diş implantı) ve gıdalarda (süt ve süt ürünleri sanayi) oluşarak kalp iç zarı enfeksiyonu, kistik fibröz ve periodontit gibi çeşitli enfeksiyonlara sebep olmaktadır (Gün ve Ekinci, 2009; Cortés ve ark., 2011b).



Şekil 1.5. Biyofilm oluşum aşamaları (Gupta ve ark., 2016b)

1.4.2. Biyofilm ve İlaç Direnci

Biyofilm tabakaları yalnızca insan vücuduna entegre edilen cihazların yüzeylerinde değil; vücutta oluşan herhangi bir bakteriyel enfeksiyonun bir sonucu

olarak ortaya çıkabilmektedir (Cortés ve ark., 2011b). Doğal ve endüstriyel ortamlarda gelişen biyofilmler virüslere, amiplere ve çeşitli antimikrobiyal ajanlara karşı üstün bir direnç göstermektedir (Costerton ve ark., 1999). Biyofilm yapısındaki bakteriler, konakçı bağışıklık yanıtlarına planktonik bakterilere göre daha dayanıklıdır; bu da onu antibiyotiklere karşı daha dirençli kılmaktadır.

Biyofilm ile ilişkili bakterilerin antibiyotik direncinin altında yatan mekanizmayı açıklamak için üç hipotez önerilmiştir. İlk hipotez, antibiyotiklerin biyofilmin derinliğine nüfuz edememesi sebebiyle tüm hücrelere ulaşamaması ve etkisini gösterememesidir (Stewart ve Costerton, 2001). Ayrıca biyofilmin matrisini oluşturan EPS yapısındaki polimerik maddelerin antibiyotiklerin difüzyonunu geciktirerek antibiyotik emilimini azaltabilmektedir (Shigeta ve ark., 1997). İkinci hipoteze göre ise, biyofilmin mikroortamı hızlı bir şekilde değişerek antibiyotiklerin işlevlerini kaybetmesine yol açmaktadır (De Beer ve ark., 1994). Özellikle biyofilmin derin katmanlarında oksijenin azalması ve ortamın anaerobik olması bazı antibiyotiklerin işlevini bozduğu bilinmektedir (Tack ve Sabath, 1985). Üçüncü hipotez ise hala tartışılmaktadır. Buna göre, bir biyofilmde bulunan küçük bir bakteri grubu ilaç direnci geliştirerek spor yapısıyla benzer bir koruyucu fenotip oluşturmaktadır (Gupta ve ark., 2016b).

Biyofilmi oluşturan bakterilerin serbest halde yaşayan bakterilere göre antibiyotik ilaçlara çok daha fazla direnç göstermesi ve zorlu şartlara daha dayanıklı olması sebebiyle bu bakterilerin yarattığı enfeksiyonların ve hastalıkların tedavisi oldukça zordur.

1.4.3. Bakteriyel Biyofilmlerin Tedavisinde Nanomalzemeler

Karmaşık matris yapısı sayesinde gelişen antibiyotik direnci sebebiyle biyofilm ile ilişkili enfeksiyonların kontrolü oldukça zordur. Biyofilmlerin kontrolünde geleneksel yöntemler olarak mekanik temizleme, UV radyasyon ve geleneksel antimikrobiyal ajanlar kullanılmıştır (Liu ve ark., 2017). Bunların yanı sıra, quorum sensing inhibitörleri (Rasmussen ve Givskov, 2006), antimikrobiyal peptidler (Park ve ark., 2011), enzimler (Thallinger ve ark., 2013) ve nanomalzemeler (Bakkiyaraj ve Pandian, 2014) olmak üzere farklı alternatif antibiyofilm yaklaşımlar geliştirilmiştir. Ancak bu yaklaşımların çoğunun biyofilmi kontrol etmesinde bazı kısıtlamalar bulunmaktadır.

Nanomalzemeler bu yöntemler arasında en etkili ve umut verici yaklaşımlardan biridir. Bölüm 1.2'de bahsedildiği üzere; nanomalzemeler, yüzey alanlarının boyutlarına göre büyük olması nedeniyle antimikrobiyal ajan olarak tercih edilmektedir. Nanomalzemelerin çeşitli mikroorganizma türlerine karşı antibakteriyel ve antibiyofilm etkisinin olduğu bilinmektedir. Biyofilm kontrolünde kullanılan geleneksel yöntemlerin aksine, nanomalzemeler uygun maliyetli ve kullanımı kolaydır.

1.4.4. Nanomalzemelerin Antibiyofilm Özellikleri ve Uygulamaları

Nanomalzemelerin yüksek yüzey alanı/hacim oranları ve çeşitli benzersiz fizikokimyasal özellikleri sayesinde antibiyofilm etkilerinin olduğuna inanılmaktadır (Liu ve ark., 2017). Nanomalzemeler mikroorganizmalarla; hücresel bileşenlere zarar veren ROS'ların üretimi, bakteri hücre duvarı/zarının bütünlüğünün bozulması ve DNA ve enzim aktivitesinin inhibisyonu gibi çeşitli mekanizmalar aracılığıyla etkileşime girmektedir (Maness ve ark., 1999). Gıda, biyomedikal ve endüstride kullanılan materyaller üzerindeki biyofilm oluşumunun önlenmesi ve ortadan kaldırılması önemli bir sorundur. Özellikle metal nanoparçacıklar, karbon bazlı nanoparçacıklar ve nanokompozit yapılar kullanılarak geliştirilen antibakteriyel platformlar bu sorunlara etkili ve alternatif birer çözüm olmaktadır.

Şimdiye kadar birçok farklı nanomalzeme antibiyofilm ajan olarak kullanılmıştır. Ag, TiO_2, ZnO, CuO, Fe_3O_4, MgF_2, Selenyum, CaF_2, Cu_2O, kitosan nanoparçacıkları, Au nanorod (NR) yapıları, GO, fullerenler gibi nanomalzemelerin ve bu malzemelerin birleştirilmesiyle elde edilen nanokompozitlerin; *E. coli, Enterococcus, Staphylococcus, Pseudomonas, Streptococcus, Bacillus ve Salmonella* gibi bakteri türleri üzerindeki antibiyofilm etkileri çalışılmıştır (Liu ve ark., 2017). Ancak siyah fosfor ve kompozitleriyle yapılan antibiyofilm çalışması bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında BP, BP/Au ve BP/Ag malzemelerinin *E. faecalis* ve *S. aureus* bakterilerinin oluşturduğu biyofilm yapısı üzerindeki antibiyofilm etkileri ilk defa incelenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Siyah Fosfor ile yapılan Biyolojik Çalışmalar

Siyah fosfor sahip olduğu olağanüstü mekanik, elektriksel, optik ve termoelektrik özellikleri sayesinde birçok elektronik ve fotonik uygulamada kullanılmıştır (Luo ve ark., 2015; Xu ve ark., 2016). Ancak biyolojik uygulamaları ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Kumar ve ark., 2016; Mayorga-Martinez ve ark., 2016). Genetik materyali oluşturan nükleik asitlerin (DNA, RNA) ana bileşenlerinden biri olan fosfor organizma ile sağladığı yüksek derecede biyouyumluluk sayesinde biyolojik ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanıma oldukça uygundur (Lee ve ark., 2016; Sun ve ark., 2016). Siyah fosfor bugüne kadar biyosensör, biyogörüntüleme, kanser tedavisi ve ilaç salınımı gibi birçok farklı uygulamada kullanılmıştır.

Chen ve ark. tarafından 2015 yılında yapılan çalışmada Siyah Fosfor (BP) IgG antikorunun saptanması için bir alan etkili transistör (FET) biyosensörü olarak kullanılmıştır. BP tabanlı FET biyosensörü altın nanopartikülü-antikor konjugatlarıyla yüzey fonksiyonelleştirmesi yöntemiyle geliştirilmiştir. BP nanotabakaları Al_2O_3 ince filmleriyle birlikte algılama kanalı olarak kullanılmıştır. Biyosensörün yanıtı, ilgili antijen varlığında BP'nin elektrik direncindeki değişim ile belirlenmiştir (Chen ve ark., 2017c).

Kumar ve ark. tarafından 2019 yılında yapılan çalışmada BP nanoyapılı elektrot kullanılarak serum örneklerinde kalp hastalığının bir biyobelirteci olan miyoglobinin (Mb) elektrokimyasal tayini yapılmıştır. Sentezlenen BP nanotabakaları, anti-Mb DNA aptamerlerine kolayca bağlanabilmesi için poli-Lizin (PLL) ile işlevselleştirilmiştir. Geliştirilen biyosensör siyah fosforun gelişmiş elektrokimyasal özellikleri sayesinde yüksek tespit duyarlılığına sahip olmuştur (Kumar ve ark., 2016).

Sun ve ark. tarafından 2015 yılında gerçekleşen çalışmada BP nanoparçacıkları Polietilen Glikol (PEG) adı verilen katkı maddesiyle suda çözünebilir hale getirilmiştir. Geliştirilen BP nanoparçacıkları NIR ışığını verimli bir biçimde ısıya dönüştürerek kanserin hem fototermal tedavisi hem de biyogörüntüleme amaçlı kullanılmıştır (Sun ve ark., 2016).

Sun ve ark. tarafından 2017 yılında yapılan çalışmada TiL_4 ile koordine edilmiş BP kuantum noktaları meme kanseri hücrelerinin görüntülenmesi amacıyla

kullanılmıştır. TiL_4 ile koordine edilmiş BP kuantum noktalarının suda daha iyi çözünebildiği tespit edilmiştir. NIR ışığını etkili bir biçimde absorbe edebilmesiyle BP tabanlı bu yapının iyi bir biyogörüntüleme ajanı olduğu sonucuna varılmıştır (Sun ve ark., 2017).

2017 yılında Yang ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada altın nanoparçacıklarıyla katkılanan BP nanotabakaları (BP-Au) 808 nm dalga boyundaki lazer ışığının etkisinde tümör hücrelerine karşı fototermal bir nanoajan olarak kullanılmıştır. Işığın etkisinde BP-Au, yalın haldeki BP'ye göre ısıyı daha fazla artırarak kanser hücrelerini yok etmeyi başarmıştır. Yapılan sitotoksisite testleriyle sentezlenen bu antitümör etkili nanoajanın insan hücrelerine hiçbir toksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Yang ve ark., 2017c).

Sun ve ark. tarafından 2015 yılında yapılan çalışmada BP kuantum noktaları (BPQDs) prob sonikasyonu ve banyo sonikasyonunu birleştiren bir sıvı tabakalarına ayırma yöntemiyle elde edilmiştir. Sentezlenen BP kuantum noktalarına PEG konjuge edilerek kararlılığı artırılmıştır. Böylece sentezlenen BPQD-PEG yapısı 808 nm dalga boylu lazer ışığı etkisinde tümör hücrelerine karşı güçlü bir fototermal performans göstermiştir (Sun ve ark., 2015).

Yang ve ark. tarafından 2017 yılında gerçekleşen çalışmada demir oksit (Fe_3O_4) ve altın (Au) nanoparçacıkları siyah fosfor nanotabakalarına dekore edilerek yeni bir nanokompozit ($BP@Au@Fe_3O_4$) oluşturulmuştur. Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalara göre $BP@Au@Fe_3O_4$ nanokompozitinin insan hücreleriyle yüksek derecede biyouyumlu ve lazer ışığı etkisinde çok etkili bir antitümör ajanı olduğu tespit edilmiştir (Yang ve ark., 2017b).

Chen ve ark. tarafından 2016 yılında yapılan çalışmada siyah fosfor tabanlı ilaç salınım sistemi oluşturulmuştur. Siyah fosfor nanotabakalarının Doxorubicin (DOX) isimli antikanser ilacını daha önce çalışılan diğer 2 boyutlu malzemelere göre daha iyi bir şekilde taşıdığı tespit edilmiştir. BP nanotabakaları iyi bir ilaç taşıyıcısının olması yanı sıra etkili bir fototermal etki ve oksidatif stres oluşturarak ilacın antikanser etkisini de artırmıştır (Chen ve ark., 2017b).

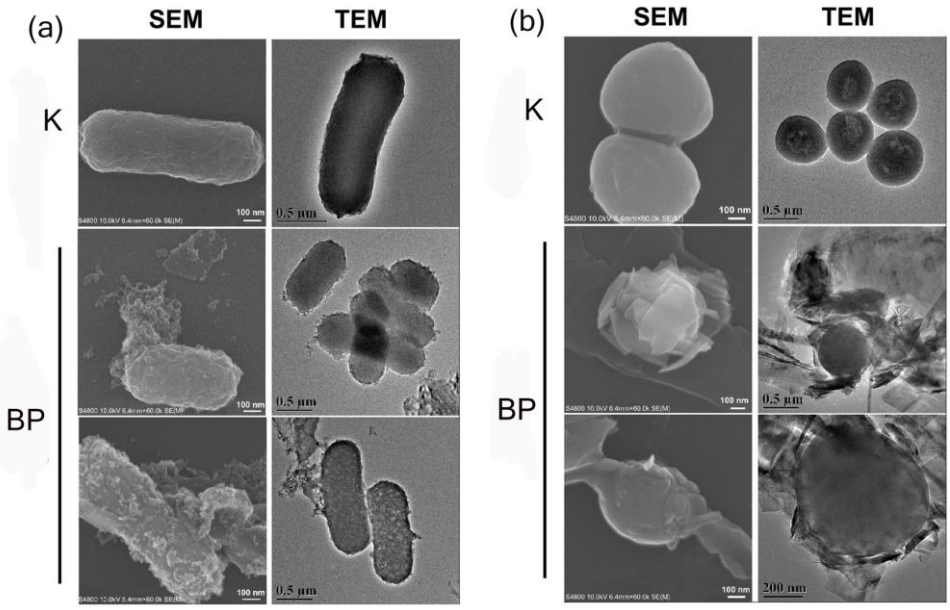
Tao ve ark. tarafından 2016 yılında yapılan çalışmada siyah fosfor nanotabakaları mekanik tabakalarına ayırma yöntemiyle sentezlenip biyouyumluluk ve kararlılığı artırılmak üzere PEG ile fonksiyonelleştirilmiştir. Oluşturulan bu yapı DOX antitümör ilacının kanser hücrelerine hedeflendirilmesinde kullanılmıştır. DOX yüklü

PEG-BP nanotabakaları in vivo ve in vitro olarak mükemmel bir biyouyumluluk sergileyerek verimli antitümör etki göstermiştir (Tao ve ark., 2017).

2.2. Siyah Fosfor ile yapılan Antibakteriyel Etki Çalışmaları

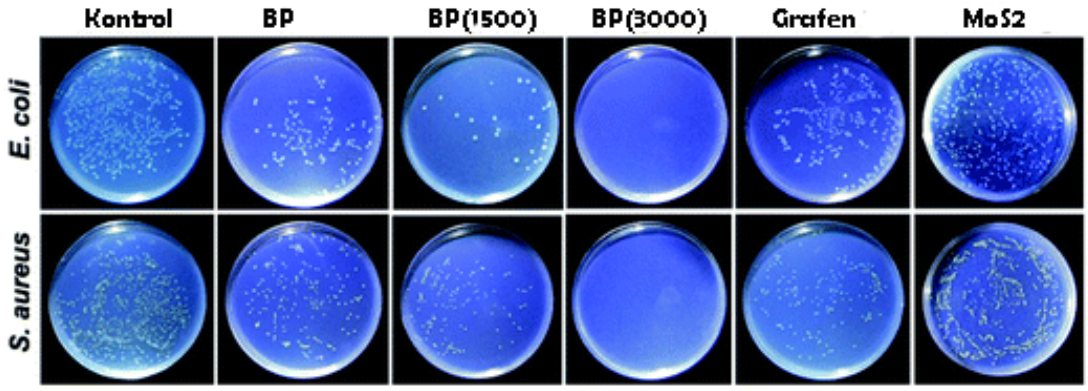
Xiong ve ark. tarafından 2018 yılında yapılan çalışmada BP nanotabakalarının iki model suş olan *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis* üzerindeki antibakteriyel etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada bakteriyel optik yoğunluk ölçümü ile büyüme eğrisi metodu ve koloni sayımı yöntemi kullanılmıştır. Bakteri kültürleri farklı konsantrasyonlardaki BP nanotabakalarıyla muamele edildikten sonra 37 °C'de inkübe edilmiştir. OD değerleri her 2 saatte bir alınmış ve 12 saatlik inkübasyon sonrası bakteri süspansiyonları seyreltilmiş ve agar petrilere yayma ekim yöntemiyle ekilmiştir. Gece boyunca 37°C'de inkübasyon sonrasında koloni sayımı yapılarak antibakteriyel oranlar hesaplanmıştır. Çalışmanın sonucunda, BP nanotabakalarının *Escherichia coli* üzerindeki antibakteriyel etkisinin *Bacillus subtilis*'e göre daha fazla olduğu gösterilmiştir. Ayrıca yapılan floresans mikroskopisi, akış sitometrisi ve SEM analizleri sonucunda antibakteriyel mekanizmasının oksidatif stres bağımlı ROS oluşumu ve membran tahribatı olduğu kanıtlanmıştır (Xiong ve ark., 2018a).

Liu ve ark. tarafından 2019 yılında yapılan çalışmada 0.01-2.0 mg mL^{-1} konsantrasyon aralığındaki BP nanotabakalarının *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* organizmaları üzerindeki antibakteriyel aktivitesi incelenmiştir. Bakteri örnekleri farklı konsantrasyonlardaki BP ile muamele edildikten sonra, ışığın antibakteriyel aktiviteyi etkileyip etkilemediğini belirlemek amacıyla karanlık, doğal ışık ve LED ışığına maruz bırakılmıştır. Oda sıcaklığında 3 saat inkübe edildikten sonra seyreltilerek agar petrilere ekilip 12 saatlik inkübasyon sonrası koloni sayımı yapılarak antibakteriyel oranlar hesaplanmıştır. Çalışmanın sonucunda, BP nanotabakalarının çalışılan en düşük konsantrasyonda bile antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Yapılan SEM ve TEM analizlerinde BP ile muamele edilen bakterilerin membran bütünlüklerinin ve morfolojilerinin bozulduğu gösterilmiştir (Şekil 2.1). Bunun dışında ışığa maruz bırakılma süresi arttıkça serbest oksijen radikallerinin oluşumunun ve antibakteriyel etkinin arttığı belirtilmiştir (Liu ve ark., 2020).



Şekil 2.1. *E. coli* (a) *ve S. aureus* (b) bakterilerinin doğal ışık altında BP ile muamele edilmeden önceki (K) ve edildikten sonraki (BP) SEM ve TEM görüntüleri (Liu ve ark., 2019)

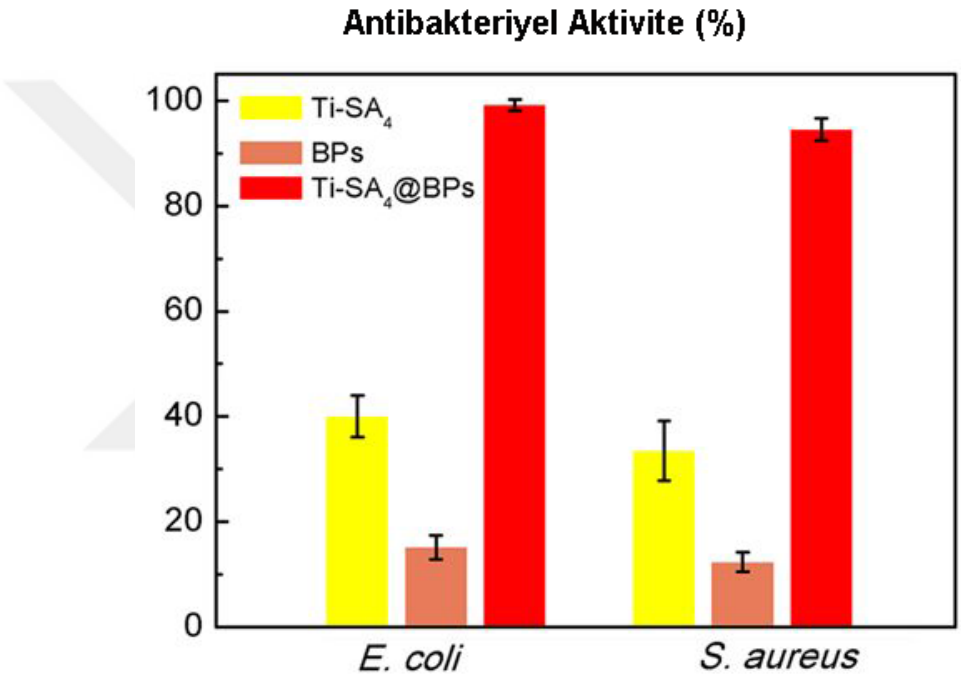
Sun ve ark. tarafından 2018 yılında yapılan çalışmada farklı kalınlıktaki BP nanotabakalarının *Escherichia coli* ve *Staphylocccus aureus* bakterileri üzerinde gösterdiği antibakteriyel etkisi MoS_2 ve grafen 2 boyutlu yarı iletken nanomalzemeleri ile kıyaslanmıştır. Her bir malzemeyle ayrı ayrı muamele edilen bakteriler 3 dk lazer ışığına maruz bırakıldıktan sonra inkübe edilmiştir. Bu çalışmada yapılan koloni sayım metodu sonucunda BP nanotabakalarının BP'nin yığın halinden daha iyi bir fototermal antibakteriyel etkiye sahip olduğu görülmüştür (Sun ve ark., 2018a). Aynı zamanda BP'nin diğer 2 boyutlu yarı iletkenlere göre (MoS_2 ve grafen) bakteriler üzerinde çok daha etkili olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Farklı kalınlıktaki BP (BP, BP(1500) ve BP(3000), Grafen ve MoS_2 ile muamele edildikten sonra petri üzerinde oluşan *E. coli* ve *S. aureus* koloni görüntüleri (Sun ve ark., 2018b)

Li ve ark. tarafından 2019 yılında yapılan çalışmada BP nanotabakaları $TiSA_4$ ile katkılanarak hibrit bir yapı sentezlenmiştir. Sentezlenen bu hibrit malzemenin yalın

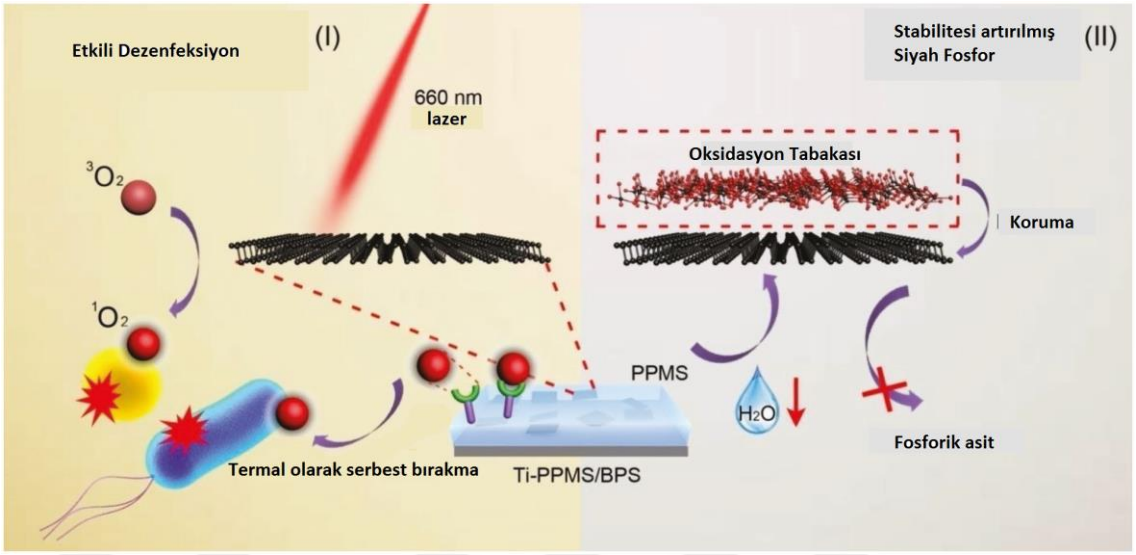
BP'den daha kararlı bir yapıda olduğu ve *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* üzerinde daha etkin bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada bakteri süspansiyonları $TiSA_4$, BP ve BP-$TiSA_4$ maddeleriyle 3 saat inkübe edildikten sonra koloni sayımı metoduyla her bir malzemenin antibakteriyel etkisi gözlemlenmiştir. Şekil 2.3'te gösterildiği gibi BP-$TiSA_4$'ün her iki bakteri üzerindeki antibakteriyel etkisi yalın BP ve $TiSA_4$'e göre daha fazladır. Yapılan floresan ve SEM çalışmalarına göre bu iki madde tek başına bakteri membranında ve morfolojisinde bir bozulma oluşturmazken; BP-$TiSA_4$ hibridinin bakteri membranında büyük hasarlar meydana getirdiği gösterilmiştir (Li ve ark., 2019a).



Şekil 2.3. $TiSA_4$, BP ve $TiSA_4$-BP hibridinin *E. coli* ve *S. aureus* üzerindeki antibakteriyel aktiviteleri (Li ve ark., 2019b)

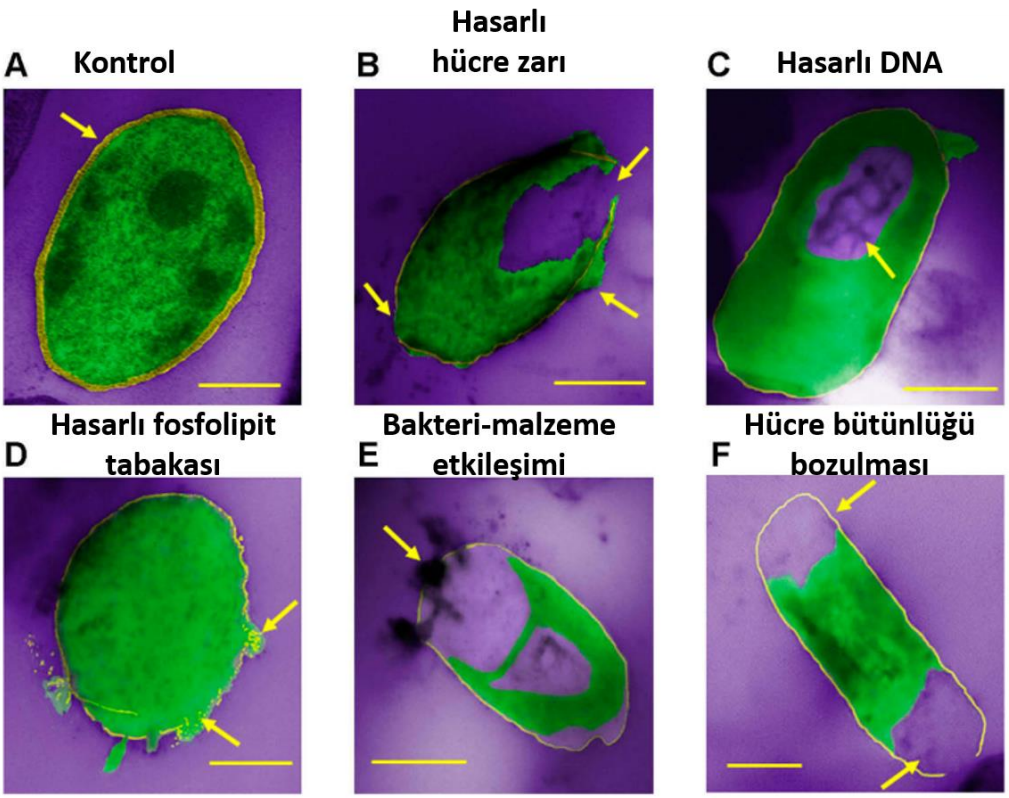
Tan ve ark. tarafından 2018 yılında yapılan çalışmada BP nanotabakaları ve poli (4-piridon metilstiren) endoperoksitten (PPMS-EPO) oluşan antibakteriyel bir film sentezlenmiştir. BP, 660 nm dalga boyundaki görünür ışık altında serbest oksijenler üretmiş ve bu PPMS-EPO denilen filmlerde saklanmıştır. BP tabanlı bu film yapısının 10 dk boyunca ışığa (660 nm) maruz bırakılmasıyla *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerinin sırasıyla %99.3 ve %99.2'sini öldürebildiği bildirilmiştir. Işık olmadığında bile bu oran sırasıyla % 76.5 ve % 69.7 olmuştur. Bu da BP-tabanlı film yapısının ışık varlığında veya yokluğunda etkili bir antibakteriyel özelliğe sahip

olduğunu göstermektedir (Tan ve ark., 2018a). Şekil 2.4'teki şemada PPMS/BP filminin antibakteriyel mekanizması gösterilmektedir.



Şekil 2.4. PPMS/BP filminin ışık varlığında ve yokluğunda serbest oksijenler üreterek bakterileri etkisiz hale getirdiğini gösteren şema (Tan ve ark., 2018b)

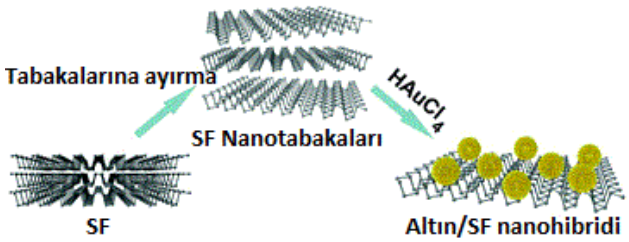
Phakatkar ve ark. tarafından 2020 yılında yapılan çalışmada BP nanotabakaları oksijensiz suda pul pul dökülme yöntemi ile sentezlenmiştir. Sentezlenen malzemenin *Escherichia coli* üzerindeki antibakteriyel aktivitesi ultramikrotom TEM tekniği ile değerlendirilmiştir. Ayrıca hasar görmüş bakterilerin membranından sızan iyonların varlığının tespiti için farklı yöntemler de kullanılarak siyah fosforun antibakteriyel etkisinin altında yatan mekanizma tespit edilmiştir. Siyah fosforun antibakteriyel performansını değerlendirmek için ise koloni sayımı yöntemi kullanılmıştır. Koloni sayımı sonuçlarına göre malzeme 50 µg/ml'de bakterilerin %87'sini; 100 µg/ml'de ise %95'ini öldürmeyi başarmıştır. Siyah fosfor tabakalarının *Escherichia coli* ile etkileşimini göstermek, nano ölçekte bakteri ve hücresel çeşitli olayları yakalamak için TEM çalışmaları yapılmıştır. TEM görüntülerine bakıldığında hiçbir malzemeyle muamele edilmeyen bakterilerin hücre zarının bütünlüğünü koruduğu gözlenirken; siyah fosfor ile etkileşen bakteri morfolojisinde önemli değişimler gözlenmiştir. Bu değişimler özetle, hücre duvarı tahribatı, hücresel bütünlüğün bozulması ve bunun sonucunda hücresel bileşenlerin hücre dışına sızması şeklindedir. Ayrıca malzeme ile muamele edilen bakterilerin DNA yapısında bozulmalar olduğu gözlenmiştir (Şekil 2.5) (Phakatkar ve ark., 2020b).



Şekil 2.5. Siyah fosfor nanotabakaları ile 3 saat boyunca muamele edilen *E. coli* bakterilerinin renkli TEM görüntüleri (Phakatkar ve ark., 2020b)

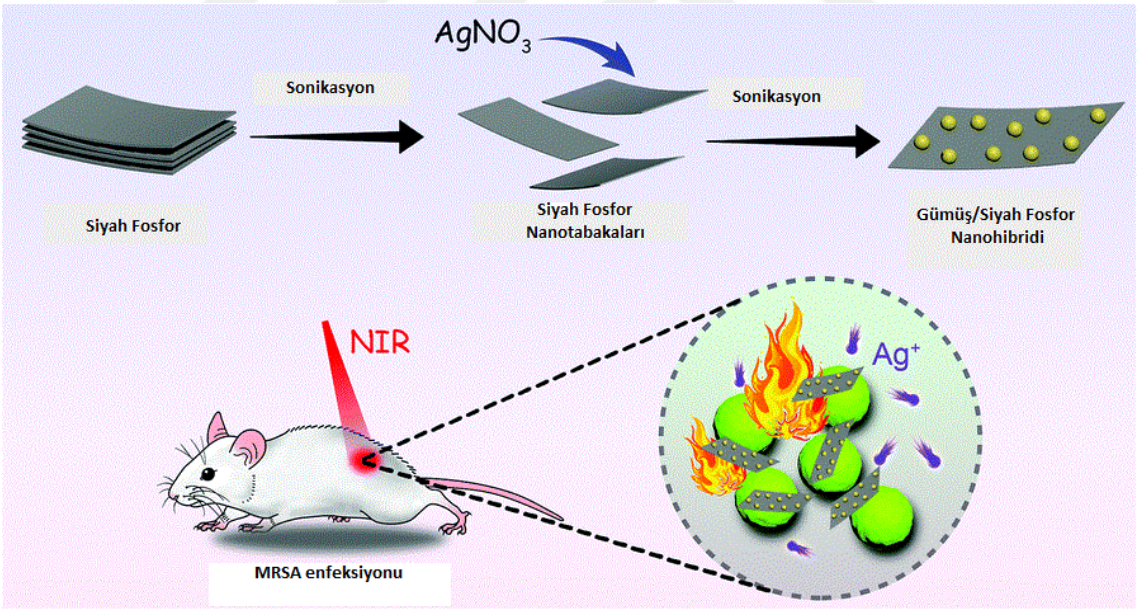
2.2. Siyah Fosfor ve Altın/Gümüş Nanoparçacıkları ile Yapılan Antibakteriyel Çalışmalar

Wu ve ark. tarafından 2018 yılında yapılan çalışmada siyah fosfor nanotabakaları altın nanoparçacıkları ile birleştirilerek Au/BP nanohibrit yapısı oluşturulmuştur (Şekil 2.6). Oluşan bu hibrit yapının oldukça yüksek bir katalitik ve antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Bu çalışma ile yüksek yüzey/hacim oranı özelliği sayesinde BP nanotabakalarına altın nanoparçacıklarının konjuge edilmesiyle daha etkili bir antibakteriyel ajan elde edilmiştir. Au/BP nanohibrit yapısının *Escherichia coli* üzerindeki antibakteriyel etkisi saatlik alınan OD ölçümleriyle hazırlanan büyüme eğrisi ve koloni sayım yöntemleriyle belirlenmiştir. Buna göre, altın nanoparçacığı içeren BP nanotabakaları bakterilerin %94.7'sini öldürerek yalın haldeki BP'den (%62.8) daha yüksek bir antibakteriyel aktiviteye sahip olmuştur. Ayrıca çalışmada, Au/BP nanohibrit yapısının insan hücrelerindeki toksik etkisine bakıldığında ihmal edilebilecek kadar az bir sitotoksik etkisinin olduğu belirlenmiştir (Wu ve ark., 2018).



Şekil 2.6. Siyah fosforun (SF) tabakalarına ayrılması ve altın nanoparçacıkları ile birleştirilmesi (Wu ve ark., 2018)

Ouyang ve ark. tarafından 2018 yılında yapılan çalışmada ise antibiyotik direncine alternatif bir çözüm olarak sinerjik bir antibakteriyel platform sunulmuştur. Çalışmada Ag NP'larla dekore edilen BP nanotabakalarının 808 nm dalga boyundaki NIR ışığı altında MRSA bakterisine karşı gösterdiği antibakteriyel etki incelenmiştir. Siyah fosforun NIR ışığı altında gösterdiği fototermal etki sayesinde AgBP nanohibrit yapısı bakteri membranını tahrip etmiş ve Ag^{+} salınımı da bakteri üremesini sürdürülebilir bir şekilde baskılamıştır (Ouyang ve ark., 2018a). *In vivo* çalışmalar AgBP nanohibridinin farelerde bakteriyel yükü azaltarak enfeksiyon ile ilişkili doku lezyonlarını en aza indirgediğini göstermiştir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Gümüş/Siyah Fosfor nanohibridinin hazırlanışı ve sinerjik antibakteriyel etkisi (Ouyang ve ark., 2018b)

2.3. Siyah Fosfor Benzeri Maddelerle Yapılan Antibiyofilm Çalışmaları

2.3.1. Grafen Oksit (GO) Tabanlı Antibiyofilm Çalışmaları

Zhao ve ark. tarafından 2018 yılında yapılan çalışmada polietilenimin ile modifiye edilen ve Ag NP ile kaplanan GO nanokompozitin (GO−PEI−Ag) *Escherichia coli ve Staphylococcus aureus*'un oluşturduğu biyofilm üzerindeki etkisi araştırılmıştır. GO−PEI−Ag'nin antibiyofilm etkisi kristal viyole yöntemi kullanılarak incelenmiştir. GO−PEI−Ag sırasıyla *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* biyofilmlerini yaklaşık 10 ve 6 kat oranlarında azaltmıştır. Bu bulgular neticesinde grafen oksit tabanlı nanokompozitin güçlü bir antibiyofilm ajan olduğu gösterilmiştir (Zhao ve ark., 2018).

Ramalingam ve ark. tarafından 2019 yılında yapılan çalışmada sentezlenen GO nanotabakalarının *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* patojenlerinin oluşturduğu biyofilm yapısı üzerindeki etkisi incelenmiştir. GO nanotabakalarının biyofilm aktivitesi kristal viyole boyaması sonrası optik yoğunluğun 570 nm'de ölçülmesiyle gözlenmiştir. Buna göre, GO nanotabakalarının her iki bakterinin biyofilm oluşumunun önlenmesinde önemli bir rol oynadığı gözlenmiştir. Yapılan bu çalışma ile, GO'in biyofilm ile ilişkili enfeksiyonların tedavisi için alternatif bir antibiyofilm stratejisi olduğu bildirilmiştir (Ramalingam ve ark., 2019a).

Naskar ve ark. tarafından 2018 yılında yapılan çalışmada Ag-ZnO-Rgo-PEG (AZGP) nanokompoziti sentezlenmiş ve bu kompozitin *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* biyofilmleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Antibiyofilm çalışmasına göre AZGP'nin sırasıyla *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* biyofilmlerini %93 ve %95 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir. Yapılan bu çalışmada sentezlenen bu kompozitin sadece oluşan biyofilm yapısını ortadan kaldırmadığı, bunun yanında biyofilm yapısının oluşmasını önlemede de başarılı olduğu bildirilmiştir (Naskar ve ark., 2018).

Jang ve ark. 2020 yılında yaptıkları çalışmada Ag/GO nanokompozit yapısının antibiyofilm etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmaya göre *Staphylococcus epidermidis* ve *Pseudomonas aeruginosa* biyofilmleri Ag/GO varlığında büyük ölçüde inhibe olmuştur. Çalışmada Ag NP'ların biyofilm yapısında önemli bir bileşen olan glikokaliksin sentezini ve quorum sensing moleküllerini inhibe ederek biyofilm yapısına zarar verdiği vurgulanmıştır (Jang ve ark., 2020).

2.3.2. Titanyum dioksit (TiO_2) Tabanlı Antibiyofilm Çalışmaları

Natarajan ve ark. tarafından 2015 yılında gerçekleştirilen çalışmada Ag ile katkılanmış TiO_2 nanokompoziti sentezlenmiş olup sentezlenen bu malzeme cam petri kabı üzerine kaplanmıştır. Ag/TiO_2 nanokompozitinin UV ışığı altında gerçekleştirdiği antibiyofilm aktivite kristal viyole deneyi ile incelenmiştir. Biyofilm oluşturması için kullanılan bakteriler *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* olup, bu bakteriler model mikroorganizma olarak seçilmişlerdir. Hazırlanan kompozitin her iki bakterinin oluşturduğu biyofilmi gidermede rol aldığı; ancak *E. coli*'de *S. aureus*'tan daha etkili olduğu gözlenmiştir (Natarajan, 2015b).

Naik ve ark. tarafından 2014 yılında yapılan çalışmada AgCl-TiO_2 NP'ların sol-jel kaplamaları potansiyel antibiyofilm ajanı olarak sunulmuştur. Burada TiO_2, gümüşün birikimini önlemek ve kontrollü salınımını sağlamak için destekleyici bir matris olarak işlev görmüştür. Yapılan bu çalışmanın sonucunda AgCl-TiO_2 kaplamasının 125 µg'da *Escherichia coli* ve *Staphylococcus epidermidis* biyofilmlerinin tamamını inhibe ettiği gözlenmektedir. Ancak *Pseudomonas aeruginosa*'nın oluşturduğu biyofilm tabakasının tamamının ancak 500 µg'da giderildiği gözlenmiştir (Naik ve Kowshik, 2014).

Jalvo ve ark. tarafından 2017 yılında yapılan çalışmada TiO_2 tabanlı kendi kendini temizleyen antimikrobiyal cam yüzeyler oluşturulmuştur. *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas putida* bakterilerinin bu yüzey üzerinde oluşturduğu biyofilm tabakaları UV ışıması altında giderilmeye çalışılmıştır. UV ışımasının tek başına bu bakterilerin oluşturduğu biyofilmi yıkmak için yeterli olmadığı; ancak TiO_2 kaplı yüzeylerde ışıma altında biyofilm oluşumunun belirgin bir şekilde ortadan kaldırıldığı gözlenmiştir (Jalvo ve ark., 2017).

2.3.3. Molibden disülfür (MoS_2) Tabanlı Antibiyofilm Çalışmaları

Singh ve ark. tarafından 2019 yılında yapılan çalışmada MoS_2 ve kurkumin kuantum noktaları ile bir MQC hibridi elde edilmiştir. Elde edilen bu yapı antibiyotiğe dirençli bakterilere karşı alternatif bir terapi yöntemi olarak kullanılmıştır. *Klebsiella pneoumoniae* bakteri kültürü ile MQC belirli şartlar altında 72 saat boyunca inkübe edildikten sonra MQC'nin biyofilm inhibisyon oranının %97'lere ulaştığı kristal viyole deneyi ile belirlenmiştir. Ayrıca bu madde varlığındaki biyofilm yapısı konfokal

mikroskopta görüntülendiğinde, MQC muamelesi sonrasında bakterilerin öldüğü ispatlanmıştır (Singh ve ark., 2019).

Roy ve ark. tarafından 2019 yılında yapılan çalışmada 2 boyutlu MoS_2 nanotabakalarına kitosan (CS) maddesi katkılanarak CS-MoS_2 sentezlenmiştir. CS-MoS_2 nanotabakaları bakteri hücreleriyle güçlü bir elektrostatik etkileşim kurarak membran depolarizasyonuna sebep olmuştur. CS-MoS_2 nanotabakaları ile hücre membranı arasındaki bu etkileşim sonucu membran bütünlüğü bozulduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda, hücre içi ROS seviyesinin artmasıyla oksidatif stres oluşmasının antibakteriyel ve antibiyofilm etkide önemli bir mekanizma olduğu belirtilmiştir. Çalışmada CS-MoS_2 maddesinin varlığında *Staphylococcus aureus* bakterisinin oluşturduğu biyofilm tabakasında %80 bir azalma olduğu gözlemlenmiştir (Roy ve ark., 2019).

Zhang ve ark. tarafından 2019 yılında yapılan çalışmada farklı antikorlarla (anti-protein A IgG, polidopamin (PDA)) ve PEG ile işlevselleştirilmiş MoS_2 nanotabakaları *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı hedeflenen fototermal bir antibiyofilm ajanı olarak kullanılmıştır. Yapılan çalışmanın sonucunda antikorlar ile hedeflenen nanokompozitin antibiyofilm aktivitesinin (> %99.) antikorlarla hedeflenmeyen nanokompozitinkinden (< %90) daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2019).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar

BacLight Bakteriyel Canlılık Kiti (LIVE/DEAD) – Thermo Fisher
Ditiobis (2-nitrobenzoik asit) (Ellman Reaktifi) – Sigma Aldrich
Fosfat Tamponu (PBS) – Sigma Aldrich
Glasiye Asetik Asit – Merck
Glutaraldehit - Sigma Aldrich
Glutatyon – Sigma Aldrich
Kristal Viyole – Merck
Mueller-Hinton Agar – Merck
Sodyum Klorür (NaCl)- Merck
Tryptic Soy Broth – Merck

3.2. Kullanılan Cihazlar

Biyogüvenlik Kabini (Mac Sistem Microbiological Safety Cabinet class II-Tip A)
Çalkalamalı Etüv (Heidolph Unimax 1010)
Floresan Mikroskobu (Olympus BX51, DP70 CCD Kamera)
İnert Azot Atmosferi (Inert Lab 2GB Glovebox)
İnkübatör (DAIHAN Scientific Incubator)
Kızılötesi Termometre (TFA ScanTemp 330)
Lazer Işık Kaynağı
Mikroplaka Okuyucu (Thermo Scientific Multiskan GO)
Otoklav cihazı (DAIHAN Scientific Autoclave)
Spektrofotometre
Taramalı Elektron Mikroskobu
Ultrasonik Banyo (Bandelin SONOREX)

3.3. Biyolojik Çalışmalarda Kullanılan Mikroorganizmalar

Çalışmada kullanılan mikroorganizmalardan *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, MRSA *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterileri standart Amerikan tipi kültür koleksiyon suşudur ve Selçuk Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.4. Analiz Metotları

3.4.1. Geçirimli Elektron Mikroskopisi (TEM)

Bu yöntem malzemelerin mikroyapısal incelenmesi ve kristal yapılarının, şekillerinin ve büyüklüklerinin belirlenmesi için kullanılır. Elektronları kullanarak nanometre boyutundaki alanları milyon katı kadar büyüterek malzemenin morfolojik bilgisine ulaşılmasına olanak sağlar.

3.4.2. X Işınları Kırınımı (XRD)

Antibakteriyel ve antibiyofilm ajan olarak kullanılan malzemelerin nitel analizi ve saflıklarıyla ilgili bilgi verir. X-ışını analizi iki aşamadan meydana gelmektedir. İlk aşamada elemente ait pik görüntüsü elde edilirken, ikinci aşamada elde edilen pik görüntüsünün element veri tabanında karşılaştırmalı analizleri yapılarak hangi tür element olduğu belirlenir.

3.4.3. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

Bu yöntem ile bakteri hücrelerinin morfoloji, büyüklük ve yüzey yapılarının incelenmesi ve nanomalzemeler ile muamele edilen ve edilmeyenler arasındaki farkların belirlenmesi sağlanır.

3.4.4. Raman Spektroskopisi

Bu teknik malzemelerin kristal yapılarının karakterize edilmesi amacıyla kullanılır. Bir uyarıcı foton ile tetiklenen fononların etkileşime girmesiyle, uyarıcı fotondan bir fonon kadar yüksek veya düşük enerjili bir foton oluşmasıyla saçılma prensibine dayanır.

3.4.5. Zamana Bağlı Emisyon Spektroskopisi (TRES)

Bu yöntem ile belirli zaman ölçeklerinde nanomalzemelerdeki meydana gelen dinamik süreçler ve değişimler incelenir.

3.4.6. Spektrofotometri

Bakteri hücrelerinin veya maddelerin yoğunluğunu belirli dalga boyları arasındaki ışıkta ölçmeye yarayan tekniktir.

3.4.7. Floresan Mikroskopisi

Bakteri hücrelerinin floresan maddelerle boyanması ve bu boyaların floresan ışık ile uyarılması sonucu bakterilerin görüntülenmesi için kullanılan bir analiz yöntemidir.

3.5. Nanomalzemelerin Sentezlenmesi

3.5.1. Siyah Fosfor (BP) Kristali ve Nanotabakaları Sentezi

Siyah fosfor kristalleri literatürde kullanılan kimyasal buhar taşıma yöntemi ile sentezlenmiştir (Liu ve ark., 2015b; Wang ve ark., 2019a). 20 mg Sn, 10 mg SnI_4 ve 500 mg kırmızı fosfor bir kuvars ampule aktarılmış ve ampul vakum altında kapatılmıştır. İlk olarak, sıcaklık 5 saat içinde 620 °C'ye yükseltilmiş ve 2 saat bu sıcaklıkta tutulmuştur. Daha sonra, 485 °C'ye kadar soğutulup, 2 saat bu sıcaklıkta tutulduktan sonra oda sıcaklığına kadar düşürülmüştür. Bu aşamadan sonra ampul tolüen içinde açılıp, siyah fosfor kristalleri elde edildikten sonra, yüzey safsızlıklarının giderilmesi için 30 dakika boyunca mutlak etanol içerisinde sonike edilmiştir. Saflaştırılmış siyah

fosfor kristalleri, bir sonraki kullanım için vakumlu sızdırmaz bir kap içine aktarılmıştır. Belli bir miktar siyah fosfor tartılıp oksijensiz suda 6 saat boyunca sonike edilmiştir.

3.5.2. Altın Nanoparçacıklarının (Au NP) Sentezi

Altın nanoparçacıklarının sentezi, dört boyunlu sıcaklık kontrollü bir reaktörde sürekli Argon (Ar) akışı altında 4 °C'de gerçekleştirilmiştir. 200 mg $HAuCl_4$, 10 mL tetralin ve 10 mL OAm karışımı içerisinde çözdürülmüştür. 44 mg BTB, 1 mL tetralin ve 1 mL OAm içerisinde çözdürüldükten sonra reaktöre ilave edildi. İlave işleminden sonra karışım, 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra reaktöre 40 mL aseton ilave edilip çözelti 8500 rpm'de 8 dakika santrifüjlenmiştir. Çökelti 20 mL hekzan içerisinde çözdürüldükten sonra etanolde santrifüjlenmiştir. Çökeltideki nanoparçacıklar 5 mL hekzan içerisinde yeniden dağıtılmış ve altın nanoparçacıklar hazır hale gelmiştir.

3.5.3. Gümüş Nanoparçacıklarının (Ag NP) Sentezi

Gümüş nanoparçacıklarının sentezi literatürde daha önceden belirtildiği şekilde sentezlenmiştir (Balkan ve ark., 2020). Sentez için 0.35 mmol Ag, 1 mL OAc, 3 mL OAm ve 11 mL ODE içerisine aktarıldıktan sonra sürekli Ar gazı akışı altında önce 60 °C'de 10 dakika, daha sonra 180 °C'de 30 dakika tutulmuştur. Karışımın oda sıcaklığında soğuması bekletilip toplanması için 2 mL hekzan eklenmiştir. 40 mL izopropanol ilave edilerek karışım 8500 rpm'de 12 dakika santrifüjlenmiştir. Karışıma tekrar 40 mL etanol eklenerek bir kez daha santrifüjlendikten sonra Ag NP 10 mL hekzan içerisinde dağıtılarak daha fazla kullanım için toplanmıştır. Tüm sentez karanlık koşullarda gerçekleştirilmiştir.

3.5.4. Siyah Fosfor/Altın Nanokompozit (BP/Au) Hazırlanışı

Hekzan içerisinde dağıtılmış belirli miktardaki Au NP ultrasonik bir banyo içinde sürekli ve sabit sonikasyon altında, hekzan içerisinde bulunan siyah fosfor karışımına damla damla ilave edilmiştir. Elde edilen çözelti, altın nanoparçacıklarının siyah fosfor nanotabakalarına başarılı bir biçimde sabitlenmesini sağlamak için 2 saat daha sonike edilmiştir. Sonikasyon işleminin ardından karışıma etanol eklenmiş ve katı faz santrifüj yardımıyla ayrılmıştır.

3.5.5. Siyah Fosfor/Gümüş Nanokompozit (BP/Ag) Hazırlanışı

Belirli bir miktardaki BP malzemesi hekzana aktarılmış ve Ag NP'lar eklenmeden önce sonike edilmiştir. Ag NP'lar eklendikten sonra nanoparçacıkların BP nanotabakalarına iyice yapışmasının sağlanması için 2 saat daha sonike edilmiştir. Sonikasyondan sonra karışıma etanol ilave edilip 1000 rpm'de 12 dakika santrifüjlenmiştir. İzole edilen katı malzeme bir gece boyunca vakumlu bir fırında kurutulmuştur. Tüm sonikasyon prosedürü BP tabakalarının kararlılığının korunması amacıyla karanlık koşullarda gerçekleştirilmiştir.

3.5.6. Sentezlenen Yapıların Karakterizasyonu

Numunelerin kristal yapı verileri Cu Kα radyasyonu (1.5406 Å) kullanılarak Bruker D8 Advance X ışınları Saçınımı cihazı ile kaydedilmiştir. TEM görüntüleri yüksek çözünürlüklü (HR) modda çalışan EXALENS (120 kV) ile bir Hitachi HT7700'den (TEM) elde edilmiştir. Raman spektroskopisi, 532 nm lazer uyarma kaynağı ile Renishaw inVia Raman Mikroskop kullanılarak kaydedilmiştir. Zamana bağlı spektroskopi ölçümleri, 377 nm lazer kaynağı kullanılarak Edinburgh Instruments FLS1000 Spektrometresi kullanılarak yapılmıştır. Numunelerin absorpsiyon özellikleri, bir Shimadzu UV-3600 UV-VIS-NIR Spektrofotometresi kullanılarak UV-VIS-NIR Spektroskopisi yoluyla kaydedilmiştir. Nanohibridin yükleme oranı Agilent 7700x Endüktif olarak eşleşmiş plazma kütle spektrometresi ile belirlenmiştir.

3.6. Fototermal Etki Ölçümü

500 µL deoksijenize su içerisinde farklı konsantrasyonlarda BP, BP/Au ve BP/Ag (0.256; 0.128; 0.064 ve 0.032 mg/mL) nanomalzemeleri ultrasonik sıcak su banyosunda sonike edilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan karışımlar 5'er dakika NIR ışığı (λ=808 nm, 1 W cm^{-2}) altında bekletilmiştir. 500 µL saf su kontrol grubu olarak kullanılmış olup, ışıma sonrası sıcaklık artışı kızılötesi termometre ile ölçülmüştür.

3.7. Antibakteriyel Aktivite Analizleri

3.7.1. Bakteri Kültürü Hazırlama

Bakteri deneylerinde kullanılacak olan tüm malzemeler her kullanımdan önce 20 dakika boyunca 121 °C'de otoklav cihazında steril hale getirilmiştir. Bakteri suşları çalkalamalı etüvde 37 °C ve 250 rpm'de 1 gece boyunca TSB besiyerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra saf bakteri kültürü elde etmek amacıyla bir halka uçlu öze dolusu bakteri kültürü MHA katı besiyerine çizgi ekim yöntemiyle ekilip statik inkübatörde 37 °C'de 1 gece boyunca inkübe edilmiştir. Bunu takiben katı besiyerinden alınan bakteriler TSB besiyerinde son konsantrasyonu 10^6 kob/ml olacak şekilde seyreltildikten sonra 96 kuyucuklu mikroplakaların belirlenen yerlerine inoküle edilmiştir. Deney 4 gruba ayrılmıştır: (1) Bakteri (*E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* ve MRSA) ; (2) Bakteri + NIR; (3) Bakteri + Nanomalzeme (BP, BP/Au veya BP/Ag) ve (4) Bakteri + Nanomalzeme + NIR (Çizelge 3.1.). (3) ve (4). gruplarda her bir malzemenin 0.128; 0.064 ve 0.032 mg/ml olmak üzere 3 farklı konsantrasyonu ayrı ayrı çalışılmıştır. 2 ve 4. gruplarda bakteriler NIR ışığı altında 5 dakika boyunca bekletilmiş ve sonrasında tüm örnekler 37 °C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir.

3.7.2. Bakteri Optik Yoğunluğunun (OD600nm) Ölçümü

3.7.2.1. Yöntemin Esası

Bakteri büyümesini takip etmek için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bakteri büyümesini belirli aralıklarla takip etmek için kullanılan en kolay yol sıvı kültürdeki bakterinin optik yoğunluğunu belirleyen spektrofotometri yöntemidir. Spektrofotometrik yaklaşım saf bir kültürdeki hücre konsantrasyonunu belirli bir dalga boyundaki saçılmış ışık ile ilişkilendirir. Bu yöntem oldukça hızlı, pratik ve canlıya zararsızdır (Koch, 1970).

Spektrofotometre, sıvı bir numunenin askıda kalan ve çözünmeyen parçacıklardan kaynaklanan bulanıklığını ölçer (Harding, 1986). Yöntemin temel mantığı, sıvı numuneden belirli bir mesafeden belirli spektrumlarda ışık gönderilmesi ve bu ışığın ne kadarının numune tarafından soğurulduğunun bulunması esasına dayanmaktadır. Bu çalışmada bakterilerin büyüme takibi 600 nm'de yapılmıştır.

3.7.2.2. Yöntemin Uygulanışı

Bakterilerin büyümesi saat başı mikroplaka okuyucuda 600 nm'de absorbans ölçümü yapılarak izlenmiştir. Numunelerin NIR ışığına maruz bırakılmadan önce OD_{600nm} değerleri okutulur ve bu değerler 0. saat değerleri olarak kabul edilmiştir. 1. saatten itibaren ölçülen tüm OD_{600nm} değerlerinden 0. saat değerleri çıkarılarak bir büyüme eğrisi oluşturulmuştur.

3.7.3. Koloni Sayım Yöntemi

3.7.3.1. Yöntemin Esası

Bu yöntemin temel prensibi belirli sıcaklıkta ve sürede inkübe edilen bakteri hücrelerinin katı bir besiyerinde oluşturduğu kolonilerin sayılarak örnekteki canlı bakteri sayısının saptanmasıdır. Koloni sayımı; dökme, yayma ve damlatma ekim olmak üzere 3 farklı yöntemle yapılabilmektedir. Bu çalışmada yayma ekim yöntemi kullanılmıştır. Yayma ekim yönteminde bakteri örnekleri ekilmeden önce koloni şeklinde sayım yapılabilmesi için mutlaka izotonik bir çözeltide seyreltilmelidir.

3.7.3.2. Yöntemin Uygulanışı

4-6 saatlik inkübasyon sonrası her bir kuyucuktan alınan numuneler seri dilüsyon yöntemiyle %0.9'luk NaCl çözeltisi ile seyreltilmiştir. Seyreltilen örneklerden 100 mikrolitre alınıp MHA besiyerine aktarılmıştır. Alkolde bekletilen drigalski spatülü alevden geçirildikten sonra soğutulup bakteriler petriye aseptik koşullarda yayılmıştır. Hazırlanan petriler statik inkübatörde 37 °C'de gece boyunca inkübe edildikten sonra, petrilerde oluşan koloniler sayılıp fotoğrafları çekilmiştir. Kontrol grubu (yalnız bakteri) referans alınarak diğer örneklerdeki bakterilerin sağ kalım oranları aşağıdaki formüldeki gibi hesaplanmıştır (Ouyang ve ark., 2018b):

Bakterilerin sağ kalım oranı (%) = (Deney grubu (kob)) / (Kontrol grubu (kob)) × 100 . (3.1)

Çizelge 3.1. Antibakteriyel aktivite çalışmasında tüm bakteriler için deney grupları

(1)	(2)	(3)	(4)
E. coli	*E. coli* / NIR	*E. coli* / BP	*E. coli* / BP / NIR
		E. coli / BP/Au	*E. coli* / BP/Au / NIR
		E. coli / BP/Ag	*E. coli* / BP/Ag / NIR
E. faecalis	*E. faecalis* / NIR	*E. faecalis* / BP	*E. faecalis* / BP / NIR
		E. faecalis / BP/Au	*E. faecalis* / BP/Au / NIR
		E. faecalis / BP/Ag	*E. faecalis* / BP/Ag / NIR
S. aureus	*S. aureus* / NIR	*S. aureus* / BP	*S. aureus* / BP / NIR
		S. aureus / BP/Au	*S. aureus* / BP/Au / NIR
		S. aureus / BP/Ag	*S. aureus* / BP/Ag / NIR
MRSA	MRSA / NIR	MRSA / BP	MRSA / BP / NIR
		MRSA / BP/Au	MRSA / BP/Au / NIR
		MRSA / BP/Ag	MRSA / BP/Ag / NIR

3.7.4. Floresan Mikroskopisi

Malzemelerle (BP, BP/Au ve BP/Ag) muamele edildikten sonra bakterilerin canlılığı ve hücre zarı bütünlüğü LIVE/DEAD BacLight boyama kiti protokolüne uygun bir şekilde floresan mikroskobunda incelenmiştir.

Bakteri suşları çalkalamalı etüvde 37 °C ve 250 rpm'de 1 gece boyunca TSB besiyerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra saf bakteri kültürü elde etmek amacıyla bir halka uçlu öze dolusu bakteri kültürü MHA katı besiyerine çizgi ekim yöntemiyle ekilmiş ve statik inkübatörde 37 °C'de 1 gece boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra katı besiyerinden alınan bakteriler TSB besiyerinde son konsantrasyonu 10^6 kob/ml olacak şekilde seyreltilip 96 kuyucuklu mikroplakalara inoküle edilmiştir. Örnekler 3 saat süresince 37 °C'de inkübe edilmiş ve sonrasında kuyucuklardan pipetaj yapılarak santrifüj tüplerine aktarılmıştır. 7000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj yapıldıktan sonra supernatant pipet yardımıyla alınmıştır. Pellet 500 mikrolitre % 0.9'luk NaCl çözeltisinde süspanse edildikten sonra oluşan karışım tekrar santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası supernatant uzaklaştırılmış ve tekrar 500 µL % 0.9'luk NaCl çözeltisinde süspanse edilip santrifüjlenmiştir. Son kez supernatant uzaklaştırılıp, pellet 250 µL % 0.9'luk NaCl çözeltisinde çözdürülmüştür.

3.7.4.1. LIVE/DEAD Boyama

3.7.4.1.1. Yöntemin Esası

Bakteri örnekleri farklı malzemelerle işleme tabi tutulduktan sonra, bakterilerin canlılığı ve membran bütünlüğü live/dead bakteriyel boyama kiti ile değerlendirilmiştir. Boyama kitinin içerisinde SYTO 9 (yeşil), Propidyum iyodür (kırmızı) boyaları ve bir adet görüntüleme yağı bulunmaktadır. Propidyum iyodür membran geçirimsiz bir boyadır ve yalnızca hasar görmüş bakterilerin DNA veya RNA'sına bağlanarak floresan ışık altında kırmızı floresans verir. Öte yandan, membran geçirimli bir boya olan SYTO 9 hasar görmemiş canlı bakterilerin membranına nüfuz ederek yeşil floresans yayar.

3.7.4.1.2. Yöntemin Uygulanışı

–20 °C'de muhafaza edilen kit dışarı çıkarılıp eritilmiştir. Her bir boyadan eşit hacimde alınıp karıştırılmıştır. 1 mL 'lik örneğe 3 µL boya karışımı eklenip oda sıcaklığında karanlık ortamda 15 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Sonrasında steril lam üzerine 5-10 µL boya-bakteri karışımı damlatılmıştır. Üzerine 45°'lik açıyla lamel kapatılmıştır. Lamelin üzerine görüntüleme yağından bir damla damlatıldıktan sonra örnekler floresan mikroskobunda 100 X büyütmede görüntülenmiştir.

3.7.5. Bakteri Hücrelerinin Morfolojik Karakterizasyonu (SEM)

Bakteri suşları çalkalamalı etüvde 37 °C ve 250 rpm'de 1 gece TSB besiyerinde inkübe edildikten sonra saf bakteri kültürü elde etmek amacıyla bir halka uçlu öze dolusu bakteri kültürü MHA katı besiyerine çizgi ekim yöntemiyle ekilmiş ve statik inkübatörde 37 °C'de 1 gece boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra katı besiyerinden alınan bakteriler TSB besiyerinde son konsantrasyonu 4×10^7 kob/ml olacak şekilde seyreltilip 96 kuyucuklu mikroplakalara inoküle edilmiştir. Örnekler 3 saat süresince 37 °C'de inkübe edildikten sonra kuyucuklardan pipetaj yapılarak santrifüj tüplerine aktarılmıştır. 4000 rpm'de 6 dakika santrifüj yapılmıştır. Supernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet 3 kez fosfat tamponuyla yıkanmıştır. Tüm bakteri örnekleri %2.5'lik Glutaraldehit solüsyonunda 2 saat boyunca fikse edilmiştir (Li ve ark., 2019a). Fiksasyon sonrası tüm örnekler 3 defa fosfat tamponuyla yıkanıp daha sonra her bir

örnek ikişer defa olmak üzere %50'lik ve %100'lük susuz etanolde 10'ar dakika bekletilmiştir. Örnekler tamamen kuruduktan sonra altınla kaplanmış ve taramalı elektron mikroskobunda görüntülenmiştir.

3.8. Glutatyon Tükenme Deneyi (Oksidatif Stres Analizi)

3.8.1. Yöntemin Esası

Bu metot Ditiobis (2-nitrobenzoik asit) (DNTB) molekülünün (Ellman reaktifi) GSH ile gerçekleşen reaksiyonuyla sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB)'ye dönüşmesinin kantitatif olarak ölçümünü esas almaktadır. Oluşan TNB ortamda bulunan GSH seviyesiyle doğrudan ilişkilidir. Ortamdaki GSH miktarı ne kadar fazlaysa TNB miktarı da o kadar fazladır. TNB'nin absorbans değeri 405 nm'de ölçülür.

3.8.1. Standart Eğri Hazırlama

Glutatyon (GSH) tükenme deneyine başlamadan önce standart bir GSH eğrisi hazırlanmıştır. Bunun için 0-400 µM konsantrasyon aralığında GSH çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler 10 µL Ellman reaktifi çözeltisi ile karıştırılıp 15 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 405 nm'deki absorbans değerleri mikroplaka okuyucuda (OD405nm) ölçülmüştür. Sonuç olarak standart bir konsantrasyon-absorbans grafiği oluşturulmuştur.

3.8.2. GSH Tükenme Deneyi

Deney 4 farklı gruptan oluşmuştur. Her bir kuyucuğa 100'er µL GSH konulmuştur. (1) GSH; (2) H_2O_2; (3) Nanomalzeme (BP, BP/Au veya BP/Ag) ve (4) Nanomalzeme + NIR (Çizelge 3.2). H_2O_2 GSH'ın oksidasyonunu etkinleştirmek için deneyde pozitif kontrol olarak kullanılmışken; yalnız GSH'ın olduğu örnek negatif kontrol olarak kullanılmıştır. (3). ve (4). gruplara nanomalzemeler eklenirken (her biri ayrı ayrı çalışılmıştır) ; (4). grup malzemeler eklendikten sonra 5 dakika NIR ışığına maruz bırakılmıştır. Karanlık ortamda 6 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örneklerden 100 µL alınıp, 100 µL fosfat tamponuyla karıştırılmıştır. Ardından 10 µL Ellman reaktifi çözeltisi ile karıştırılıp 15 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra

405 nm'deki absorbans değerleri mikroplaka okuyucuda ölçülmüştür (Rasool ve ark., 2016). Örneklerde kalan GSH konsantrasyonları önceden hazırladığımız standart eğriye göre hesaplanmıştır. Daha sonra kaybedilen GSH oranları aşağıdaki formüle göre bulunmuştur:

GSH Kaybı (%) = ((Kontrol – Örnek) / Kontrol) × 100. (3.2)

Çizelge 3.2. Oksidatif stres çalışmasında deney grupları

(1)	(2)	(3)	(4)
GSH	GSH + H_2O_2	GSH + BP	GSH + BP / NIR
		GSH + BP/Au	GSH + BP/Au / NIR
		GSH + BP/Ag	GSH + BP/Ag / NIR

3.9. Antibiyofilm Aktivite

3.9.1. Kristal Viyole Deneyi

3.9.1.1. Yöntemin Esası

Bakteri kültürleri mikroplakalarda belirli bir süre inkübe edildikten sonra kuyucuklar planktonik bakterilerin uzaklaştırılması için boşaltılır ve yıkanır. Yıkama aşamasından sonra boyama amacıyla kuyucuklara kristal viyole eklenir ve biyofilm tabakasına nüfuz etmesi için bir süre bekletilir. Daha sonra biyofilm matriksine bağlanmamış fazla boyanın uzaklaştırılması için kuyucuklar boşaltılarak yıkanır. Bu aşamada kristal viyole biyofilm içerisindeki bakteri hücrelerini ve hücre dışı matrisi boyar, biyofilm haricindeki tüm hücre ve maddeler uzaklaştırılır. Kristal viyole ile boyanmış biyofilm kütlesi glasiyel asetik asit ile çözdürüldükten sonra spektrofotometrik ölçüm yapan bir mikroplaka okuyucuda 570 nm'de ölçüm yapılarak optik yoğunluk değerleri belirlenir. Bu değerler kontrol kuyucuklarının ortalama optik yoğunluk değerleriyle kıyaslanarak biyofilm inhibisyon oranları bulunur (Ozturk ve ark., 2014).

3.9.1.2. Yöntemin Uygulanışı

BP, BP/Au ve BP/Ag nanomalzemelerinin (MİK altı doz olan 64 µg/ml konsantrasyonda) *E. faecalis* ve *S. aureus* suşları üzerindeki antibiyofilm aktivitelerini

incelemek için antibakteriyel aktivite çalışmasından sonra (37 °C'de 24 saat inkübasyon) 96 kuyucuklu mikroplakadaki tüm örnekler nazikçe dökülmüştür. Her bir kuyu üçer kez fosfat tamponu ile yıkanıp ters çevrilerek kurutulmuştur. Mikroplakalar kuruduktan sonra her bir kuyuya Kristal Viyole çözeltisi (%0.1, w/v) yüklenmiş ve 15 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda boyalar dökülmüş ve kuyular üçer kere distile su ile yıkanıp ters çevrilerek kurutulmuştur. Daha sonra her bir kuyuya asetik asit çözeltisi (%33, v/v) eklenmiş ve 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bu aşamadan sonra tüm örnekler 570 nm dalga boyunda Thermo Scientific Multiskan GO mikroplaka okuyucuda okutulmuştur. Biyofilm inhibisyon (%) değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Albayrak, 2018);

Biyofilm inhibisyon oranı (%) = (((C – B) – (T – B)) / (C – B)) × 100. (3.3)

B, negatif kontrol (yalnız besiyeri) için kuyu başına ortalama absorbans değeri; C, pozitif kontrol (yalnız bakteri) için kuyu başına ortalama absorbans değeri; T ise nanomalzemelerle muamele edilmiş kuyulardaki ortalama absorbans değeridir.

3.9.2. İstatistiksel Analiz

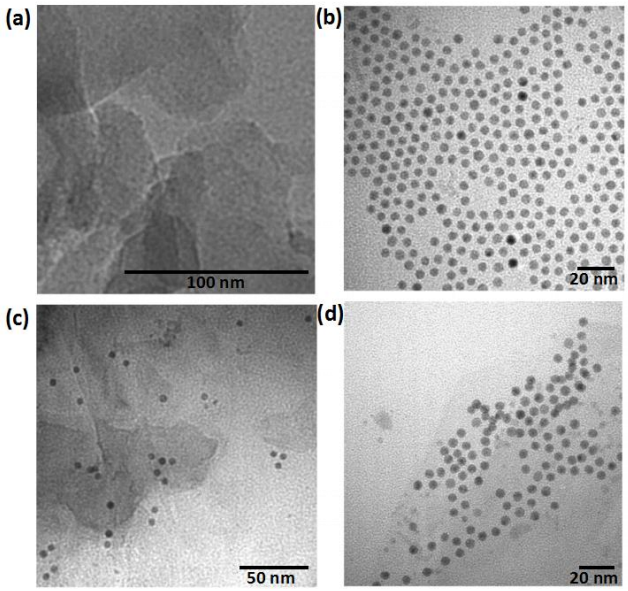
Biyofilm çalışmaları üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizler GraphPad Prism 8 programında One sample t test kullanılarak yapılmıştır. *P* değerleri < 0.05 olarak belirlenen değerler istatistiksel açıdan önemli olarak değerlendirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. BP ve BP-Au Nanomalzemelerinin Yapısal Analizleri

4.1.1. TEM Analiz Sonuçları

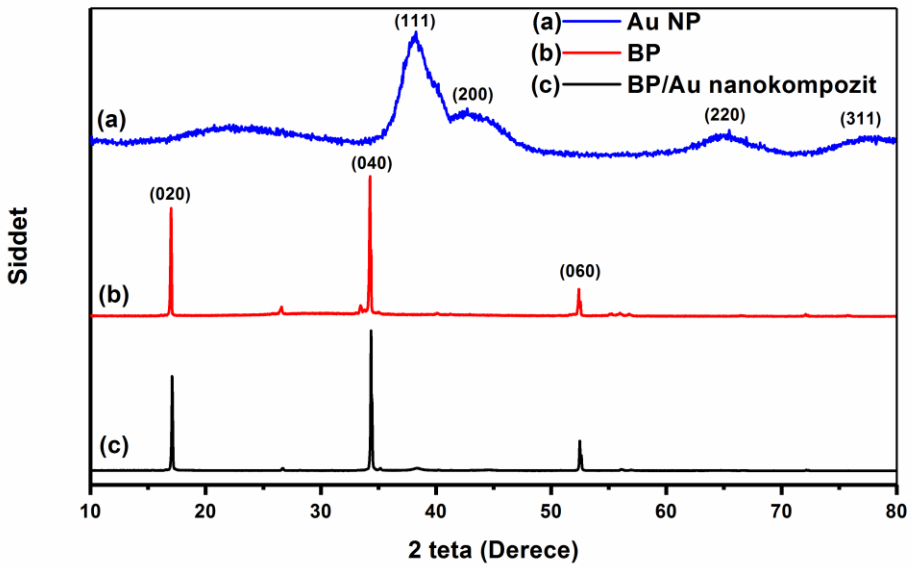
Şekil 4.1(a)'daki TEM görüntüsünde, elde edilen siyah fosfor nanotabakalarının çok ince katmanlı bir 2 boyutlu yapıya sahip olduğu görülmektedir. Ayrı bir düzenekte Au NP'lar 4 °C'de yüzey aktif, indirgeyici ve çözücü madde olarak görev yapan oleylamin, tert-butilamin boran ve tetralin kullanılarak yüzey aktif madde destekli kimyasal indirgeme yöntemiyle sentezlenmiştir. Şekil 4.1(b)'de bulunan TEM görüntüsünde görüldüğü gibi Au NP'lar monodispers dağılıma sahip ve ortalama büyüklükleri 5 nm'dir. Daha sonra sentezlenen Au NP'lar sıvı-faz kendi kendine birleştirme yöntemi ile BP nanotabakaları üzerine başarılı bir şekilde yerleştirilerek BP/Au nanokompoziti elde edilmiştir. Şekil 4.1(c),(d) elde edilen BP/Au nanokompozitinin TEM görüntülerini göstermektedir. Au NP'lar başlangıç boyutlarını ve morfolojilerini koruyarak BP nanotabakalarına başarılı bir şekilde eklenmiştir. ICP-MS analizi kullanılarak BP/Au nanokompozitinin Au yükleme oranının ağırlıkça %2 olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.1. (a) BP nanotabakaları **(b)** Au NP'lar ve **(c,d)** farklı büyütmelerdeki BP/Au nanokompozitinin TEM görüntüleri.

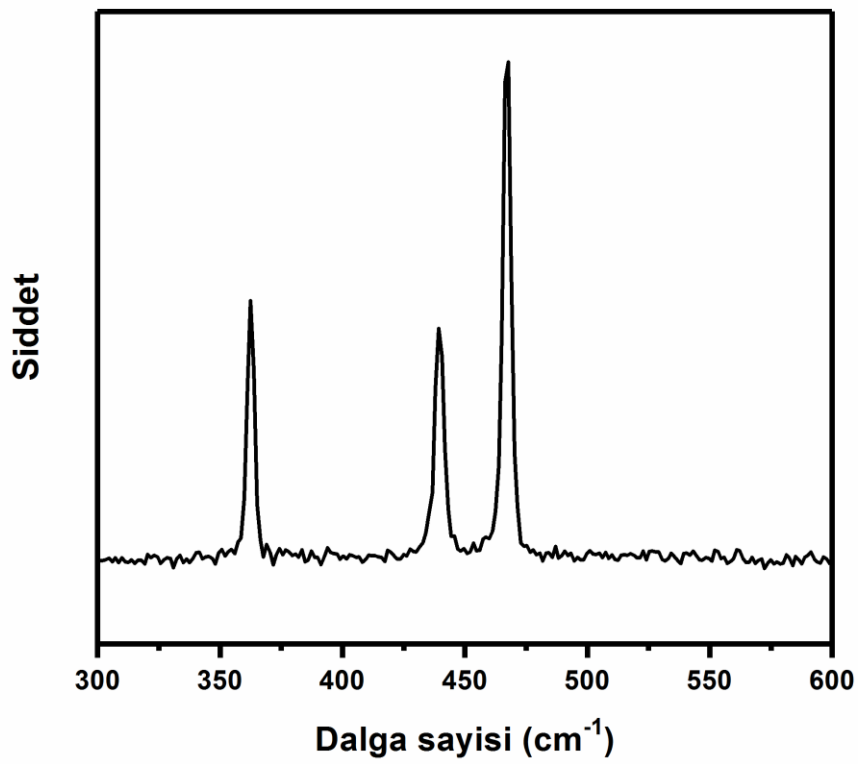
4.1.2. XRD ve Raman Analiz Sonuçları

Şekil 4.2'de verilen XRD spektrumunda BP nanotabakaları, Au NP'lar ve BP/Au nanokompozitinin kristal yapısı gösterilmiştir. Şekil 4.2(b)'de gösterilen BP'nin XRD paterni 17, 34.5 ve 52.5° olmak üzere sırasıyla (020), (040) ve (060) düzlemlerine karşılık gelen üç keskin ve yoğun kırınım piki vermiş olup bu değerler literatürde başarılı bir şekilde sentezi gerçekleştirilen ortorombik kristalin BP paterni ile uyumluluk göstermektedir (Liu ve ark., 2015a). Au NP'ların XRD paterninde (Şekil 4.2(a)) ise yüzey merkezli kübik (ymk) Au NP'ların (111), (200), (220) ve (311) düzlemlerine karşılık gelen 38.1, 44.3, 64.5 ve 77.7°'de dört geniş pik verdiği gözlemlenmiştir. BP/Au nanokompozitinin XRD paterni ortorombik BP kristal yapısının karakteristik piklerinin tümünü gösterirken; ymk Au Np'ların sadece (100) düzlemini göstermiştir (Şekil 4.2(c)).



Şekil 4.2. (a) Au NP'lar **(b)** BP ve **(c)** BP/Au nanokompozitinin XRD paternleri

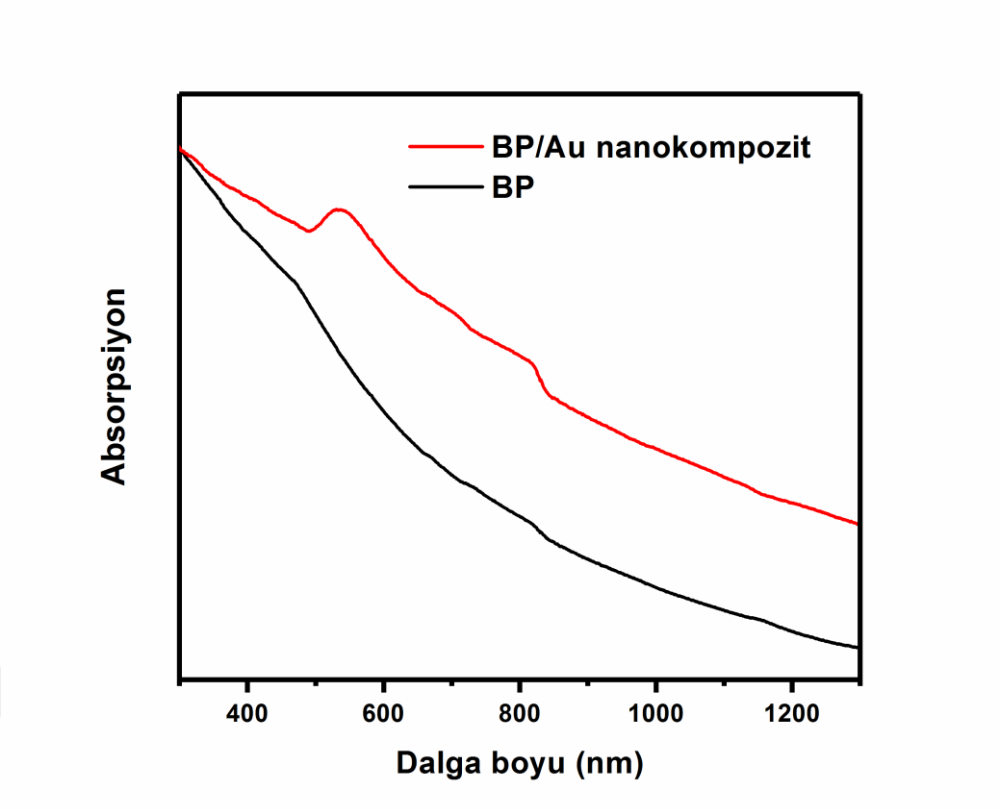
Ayrıca Şekil 4.3'te yer alan BP nanotabakalarının Raman spektrumunda sırasıyla A_g^1, B_{2g} ve A_g^2 fonon modlarını temsil eden 362, 438 ve 467 cm^{-1}'de BP'nin üç karakteristik pik noktası gösterilmiştir (Wang ve ark., 2019b).



Şekil 4.3. BP kristalinin Raman spektrumu

4.1.3. Uv-Vis-NIR Spektroskopisi Sonuçları

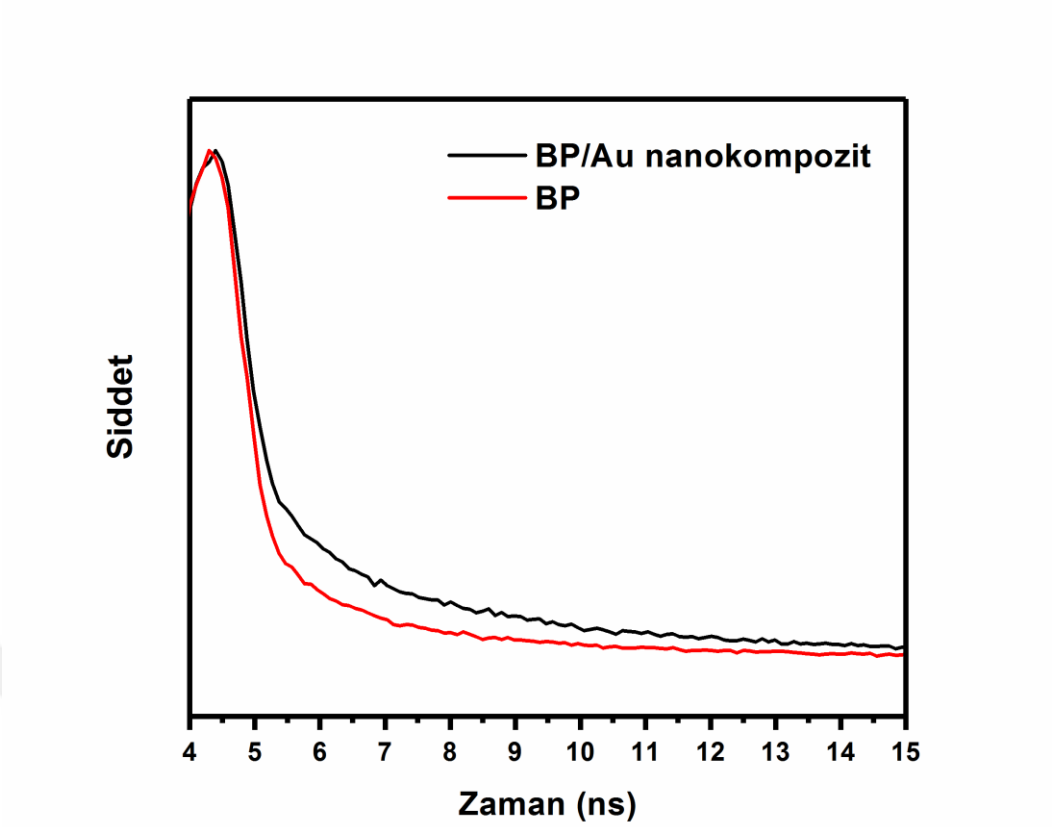
Bu tez çalışmasında BP tabanlı nanomalzemelerin fototermal antibakteriyel/antibiyofilm özellikleri incelendiği için BP ve BP/Au'nun ışık absorplama kabiliyeti UV-Vis-NIR spektroskopisi ile analiz edilmiştir. Şekil 4.4'te BP/Au'nun görünür ve kızılötesi ışığını absorplama yeteneğinin yalın haldeki BP'den daha yüksek olduğu açıkça görülmektedir. BP/Au nanokompozitinin özellikle 520 nm'de göstermiş olduğu (Şekil 4.4) bu absorpsiyon yeteneğindeki üstünlüğün muhtemel sebebinin Au NP'ların karakteristik yüzey plazmon rezonansı olabileceği düşünülmektedir (Zhu ve ark., 2013). Spektrumun geniş bir bölgesinde gerçekleşen bu güçlü absorpsiyon fototermal antibakteriyel uygulamalar için faydalı olan ışıkla uyarılmış elektron sayısının artmasıyla sonuçlanmaktadır.



Şekil 4.4. BP ve BP/Au nanokompozitinin UV-vis-NIR absorpsiyon spektrumları

4.1.4. TRES Analiz Sonuçları

BP nanotabakaları ve BP/Au nanokompozitinin zamana bağlı emisyon spektrumu (TRES) analizi fotojenere edilmiş yük çiftlerinin rekombinasyon davranışını açıklamak için gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.5'te görüldüğü gibi BP/Au nanokompozitinin bozulma ömründe hem hızlı hem de yavaş bileşenlerinde yalın haldeki BP'ye kıyasla bir artış gözlenmektedir. Bu artışın BP nanotabakaları ile Au NP'lar arasında oluşan Schottky bariyerinden kaynaklandığı sonucuna varılabilir. Ayrıca, bu bariyer elektron geri akışının önünde bir engel görevi görür; bu nedenle rekombinasyon kısıtlanır ve nanokompozitin ömrü uzatılır. BP/Au nanokompozitindeki Au NP'lar, ışınlanmış BP'den gelen elektronları hapseden ve böylece boşluklarla rekombinasyonlarını önleyen fotoindüklenmiş bir elektron havuzu görevini görür. Çizelge 4.1'de malzemelerin bozulma ömürleri (τ_i) ve genlikleri (A_i) verilmiştir.



Şekil 4.5. Yalın haldeki BP ve BP/Au nanokompozitinin zamana bağlı emisyon spektrumları

Çizelge 4.1. BP ve BP/Au nanokompozitlerinin bozulma ömrü(τ_i) ve genlikleri (A_i)

Malzeme	**A_1**	**τ_1 (ns)**	**A_2**	**τ_2(ns)**
BP	0.36	1.5	0.64	6.6
BP/Au	0.34	2	0.66	7.8

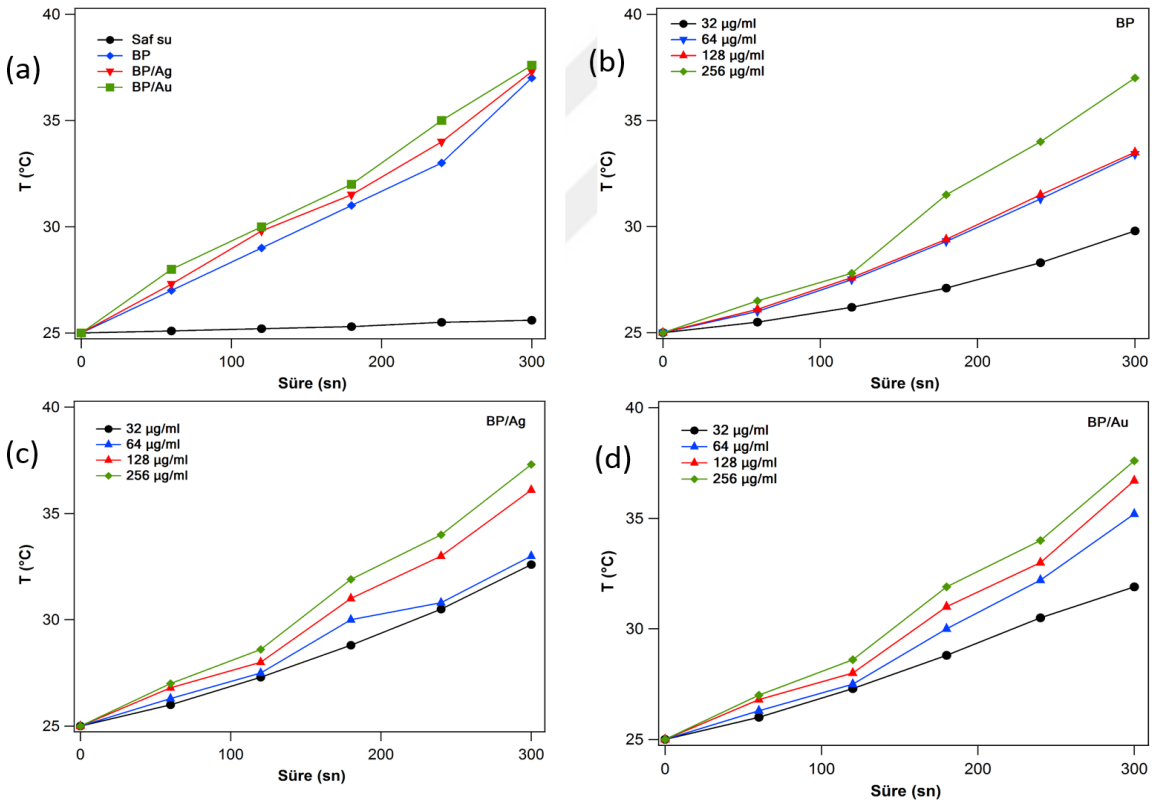
4.2. BP, BP-Au ve BP-Ag Nanomalzemelerinin *E. coli, E. faecalis, S. aureus ve MRSA* üzerindeki Antibakteriyel Aktivitesi

4.2.1. Fototermal Etki Sonuçları

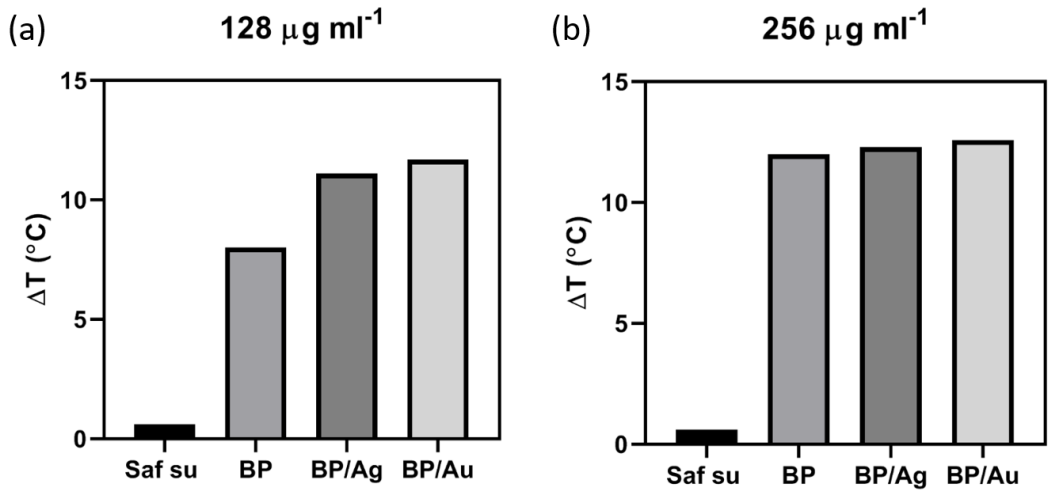
500 µL deoksijenize su içerisinde farklı konsantrasyonlarda sıcak su banyosunda sonike edilerek hazırlanan BP, BP/Au ve BP/Ag (256; 128; 64 ve 32 µg/ml) nanomalzemeleri 5'er dakika NIR ışığı (ƛ=808 nm, 1 W cm^{-2}) altında bekletildikten

sonra sıcaklık artışı kızılötesi termometre ile ölçülmüştür. Saf su kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Şekil 4.6'da saf su ve nanomalzemelerin NIR ışığı altında açığa çıkardığı sıcaklık artış grafikleri görülmektedir. Yalnızca saf su NIR ışığına tutulduğunda sıcaklık değişiminin 0.6 °C olduğu belirlenmiştir. Maddelerin konsantrasyonu arttıkça sıcaklıklarının da arttığı belirlenmiştir (b, c, d). Şekil 4.7'de ise malzemelerin 128 ve 256 µg/ml konsantrasyonda iken ortamdaki sıcaklık değişimini gösteren bar grafikleri görülmektedir. BP, BP/Ag ve BP/Au'nun 128 µg/ml konsantrasyonlarındaki sıcaklık artışlarının sırasıyla 8, 11.1 ve 11.7 °C iken; 256 µg/ml konsantrasyonlarındaki sıcaklık artışlarının sırasıyla 12, 12.3 ve 12.6 °C olduğu gözlemlenmiştir. Maddelerin konsantrasyonu 128 µg/ml iken fototermal etkilerinde belirgin bir fark olduğu sonucuna varılmıştır. Buna göre BP/Au'nun fototermal etkisinin en yüksek; BP'nin ise en düşük olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.6. (a) Saf su, BP, BP/Ag ve BP/Au çözeltilerinin (256 µg/ml) NIR ışıması (808 nm, 1 W cm^{-2}) sonrasındaki sıcaklık artışı. **(b)** BP **(c)** BP/Ag ve **(d)** BP/Au'nun farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinin NIR ışıması sonrasındaki sıcaklık artış grafikleri.



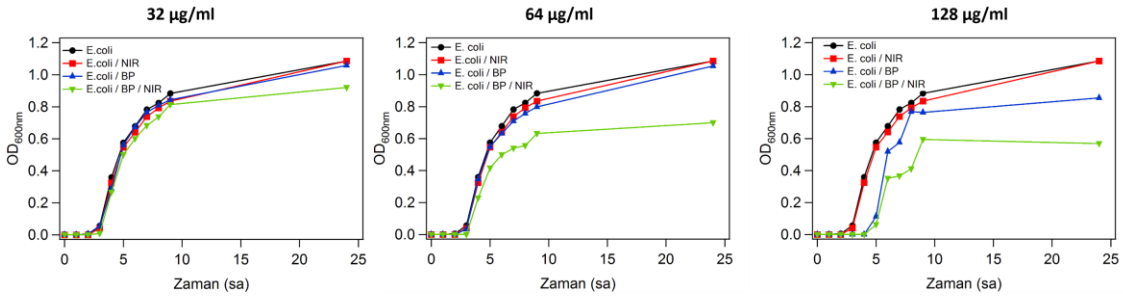
Şekil 4.7. İki farklı konsantrasyonda malzemelerdeki NIR ışığı maruziyetinden sonraki sıcaklık artış

4.2.2. Bakteri Büyüme Eğrisi Sonuçları

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan BP, BP/Au ve BP/Ag malzemelerinin (32, 64 ve 128 µg/ml) *E. coli, E. faecalis, S. aureus ve* MRSA suşları üzerindeki antibakteriyel aktivitesinin belirlenmesi için öncelikle 24 saat boyunca 600 nm'de saat başı optik yoğunluğu (OD_{600nm}) ölçülmüştür. Bu ölçümler sonucunda oluşturulan büyüme eğrisi grafikleri aşağıda gösterilmiştir.

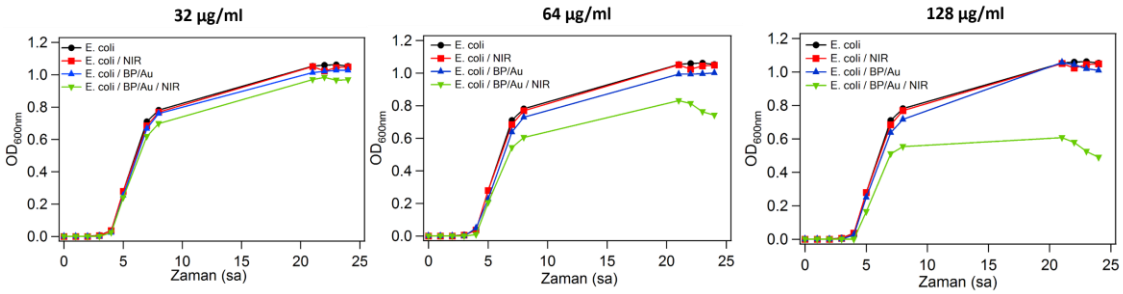
4.2.2.1. *Escherichia coli*

Şekil 4.8'de üç farklı konsantrasyondaki (32, 64 ve 128 µg/ml) siyah fosfor nanotabakalarının *E. coli* bakterisinin büyümesine olan etkisi grafik olarak verilmiştir. Yalnızca lazer ışığının (NIR, λ=808 nm, 1 W cm^{-2}) *E. coli* üremesi üzerinde bariz bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. BP nanotabakalarının lazer ile ışınlanmadığında yüksek bir antibakteriyel aktivite göstermediği; ancak ışınlanan örneklerde bakteri üremesini yaklaşık olarak %50 azalttığı gözlenmiştir. Bakteri ile muamele edilen BP malzemesinin konsantrasyonu arttıkça sergilediği antibakteriyel aktivitenin arttığı belirlenmiştir. 128 µg/ml konsantrasyonda BP *E. coli* üremesini ilk beş saat boyunca büyük oranda inhibe etmiştir; ancak beş saat sonrasında bakteriyostatik (üreme yavaşlatıcı) etkisini kaybetmiştir.



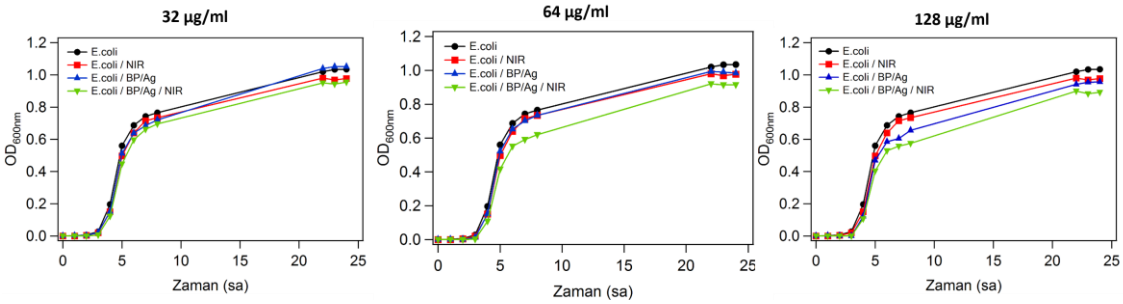
Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlardaki BP'nin (32, 64, 128 µg/ml) *E. coli* büyüme eğrisi üzerine etkileri

Şekil 4.9'da üç farklı konsantrasyondaki (32, 64 ve 128 µg/ml) BP/Au nanohibridinin *E. coli* bakterisinin büyümesine olan etkisi grafik olarak verilmiştir. BP/Au hibridinin de lazer ışığına maruz bırakılmadığında *E. coli* bakterilerinin üremesine bir etkisinin olmadığı fakat lazer ile ışınlanan örneklerdeki bakterilerin üremesini yavaşlattığı gözlemlenmiştir. Bakteri ile muamele edilen BP/Au malzemesinin konsantrasyonu arttıkça sergilediği antibakteriyel aktivitenin arttığı belirlenmiştir. Üremenin logaritmik olarak artıp en yoğun olduğu 8. saatte kontrol grubunun OD_{600nm} değeri 0.823 iken; 128 µg/ml konsantrasyonda lazer ışıması altında BP/Au malzemesine maruz bırakılan *E. coli* suşunun OD_{600nm} değeri 0.5 olduğu belirlenmiştir. 8. Saatten sonra kontrol grubu, NIR ve yalnız BP/Au'ya maruz bırakılan örneklerde bakteri üremesi artarak devam ederken; ışık etkisi altında BP/Au (64 ve 128 µg/ml) maddesine maruz bırakılan bakterilerin yoğunluğu sabit kalmış, yani üreme durmuştur.



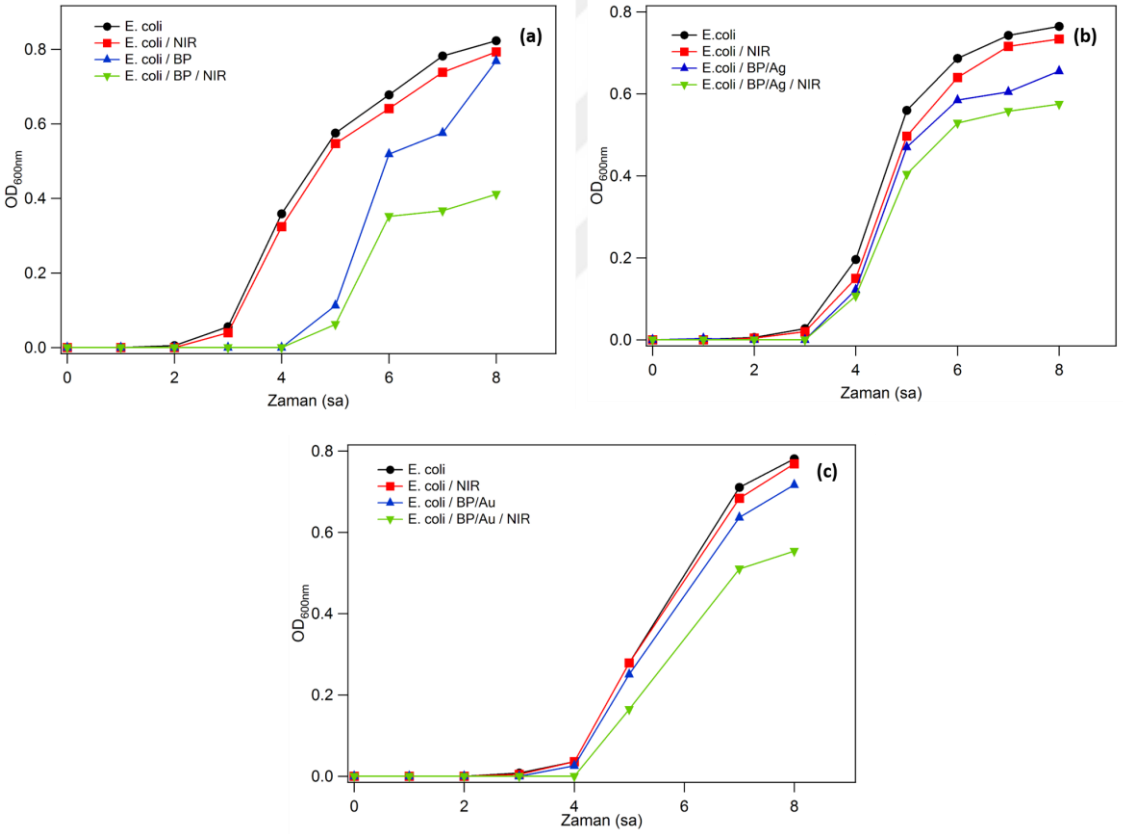
Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlardaki BPAu'nun (32, 64, 128 µg/ml) *E. coli* büyüme eğrisi üzerine etkileri

Şekil 4.10'da ise üç farklı konsantrasyondaki (32, 64 ve 128 µg/ml) BP/Ag nanohibridinin *E. coli* bakterisinin büyümesine olan etkisi grafize edilmiştir. BP/Ag malzemesi ise denenen 3 farklı konsantrasyonda da *E. coli* üremesi üzerinde etkili olmamıştır.

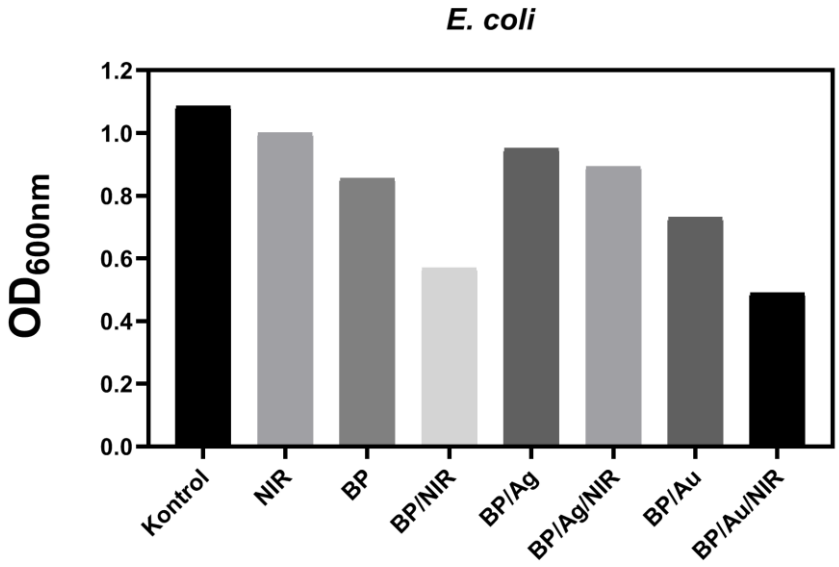


Şekil 4.10. Farklı konsantrasyonlardaki BPAg'nin (32, 64, 128 µg/ml) *E. coli* büyüme eğrisi üzerine etkileri

Şekil 4.11'de ilk 8 saat boyunca malzemelerin bakteri büyümesine olan etkileri; Şekil 4.12'de ise örneklerin 24 saat sonundaki OD_{600nm} değerleri gösterilmektedir. Sonuç olarak BP/Au'nun *E. coli* üzerinde BP ve BP/Ag'ye göre daha etkili olduğu görülmüştür.



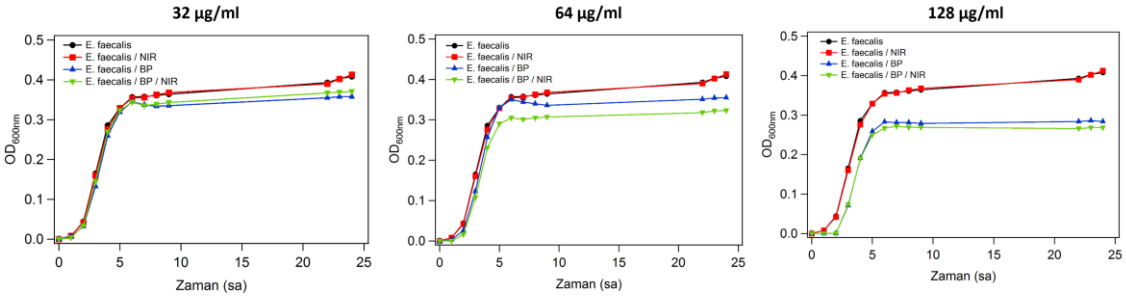
Şekil 4.11. BP, BP/Ag ve BP/Au (128 µg/ml) ile muamele edilen *E. coli* suşunun 8 saatlik büyüme eğrisi



Şekil 4.12. BP, BP/Ag ve BP/Au (128 µg/ml) ile muamele edilen *E. coli* örneklerinin 24 saat sonundaki OD_{600nm} değerleri

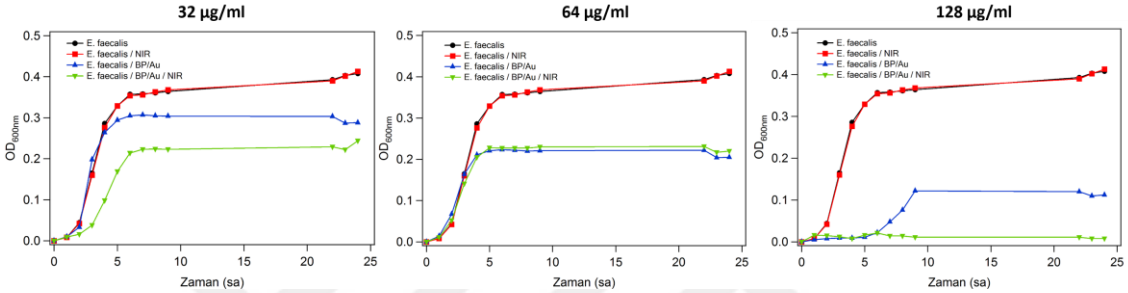
4.2.2.2. *Enterococcus faecalis*

Şekil 4.13'te üç farklı konsantrasyondaki (32, 64 ve 128 µg/ml) siyah fosfor nanotabakalarının *E. faecalis* bakterisinin büyümesine olan etkisi grafik olarak verilmiştir. Sadece lazer ışığının (NIR, λ=808 nm, 1 W cm^{-2}) *E. faecalis* üremesi üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Şekil 4.13'te görüldüğü üzere NIR ışınlaması olmadan BP muamelesinden sonra, bakterilerin optik yoğunluğu 32 ve 64 µg/ml konsantrasyonda çok belirgin olmasa da 128 µg/ml'da bir dereceye kadar azaldığı belirlenmiştir. 128 µg/ml'da BP hem lazer ışınlaması varlığında hem de yokluğunda bakteri üremesini ilk üç saat durdurmayı başarmış; ancak bu bakteriyostatik etkiyi üçüncü saatten sonra kaybetmiştir. BP'nin NIR ışık altındaki antibakteriyel etkisi NIR olmayan örneğe oranla daha fazla olsa da çok büyük bir fark olmadığı görülmüştür.



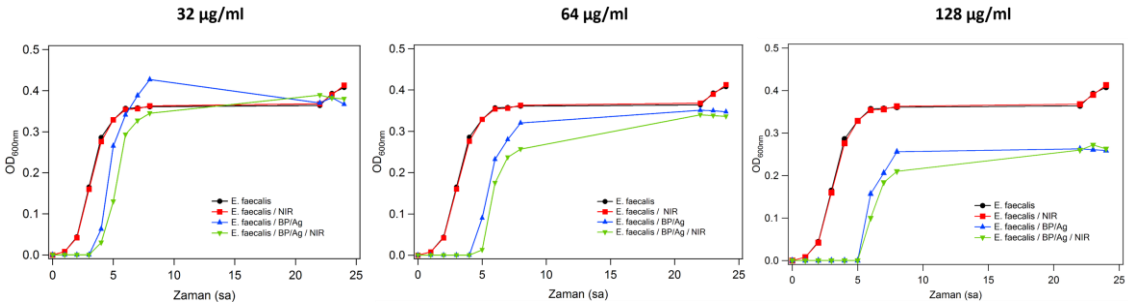
Şekil 4.13. Farklı konsantrasyonlardaki BP'nin (32, 64, 128 µg/ml) *E. faecalis* büyüme eğrisi üzerine etkileri

BP/Au hibridinin *E. faecalis* suşu üzerindeki antibakteriyel aktivitesine bakıldığında oldukça etkili olduğu görülmüştür. Şekil 4.14'te görüldüğü üzere NIR ışınlaması olmadan BP/Au muamelesinden sonra, bakterilerin optik yoğunluğu 32 ve 64 µg/ml konsantrasyonda bile belirgin olarak azaldığı gözlenmiştir. 64 µg/ml'da iken bakteri üremesini %50 oranda azaltmıştır. 128 µg/ml'da ise NIR ışınlaması olmadan BP/Au ile muamele edilen bakterilerin üremesi ilk altı saatte baskılanmıştır; ancak daha sonra bu etki kaybolup bakteriler üremeye başlamıştır. Buna karşılık, BP/Au hibridinin 808 nm NIR ışık ışınlaması ile kombinasyonu yüksek bir antibakteriyel aktivite göstermiş ve *E. faecalis* suşunun üremesi 24 saat boyunca tamamen baskılanmıştır.



Şekil 4.14. Farklı konsantrasyonlardaki BPAu'nun (32, 64, 128 µg/ml) *E. faecalis* büyüme eğrisi üzerine etkileri

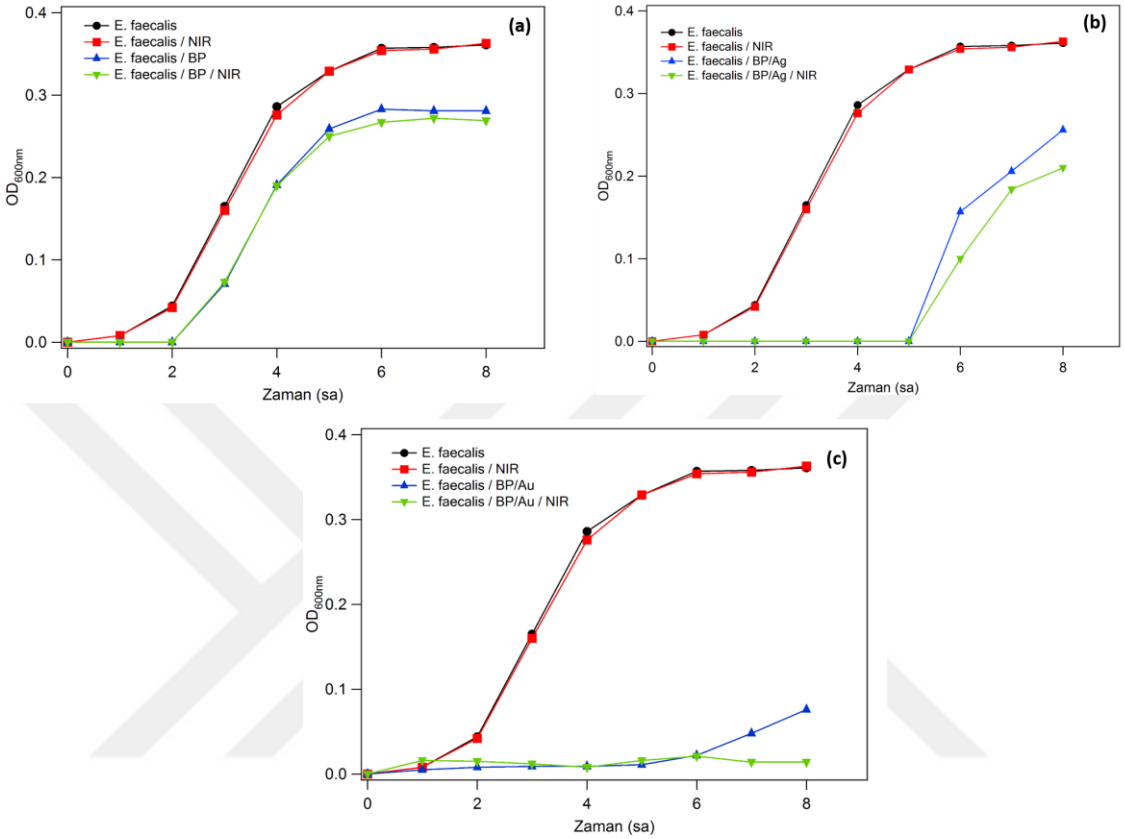
BP/Ag hibridinin 64 µg/ml'da üremenin ilk dört saati boyunca bakteri üremesini baskılamayı başardığı; ancak sonrasında bakteriyostatik etkisini kaybederek üremenin devam ettiği ve neredeyse kontrol grubu ile aynı OD değerlerine ulaştığı görülmüştür. Konsantrasyon iki katına çıkarıldığında ise bakteri üremesini ilk beş saat durdurmayı başarmıştır. Sonrasında bakteriler üremeye devam etmiş olsa da kontrol grubuna göre daha az bir üreme olduğu gözlenmiştir. BP/Ag malzemesinin *E. faecalis*'e karşı göstermiş olduğu antibakteriyel aktivitesinde lazer ışığının belirgin bir fark oluşturmadığı görülmüştür.



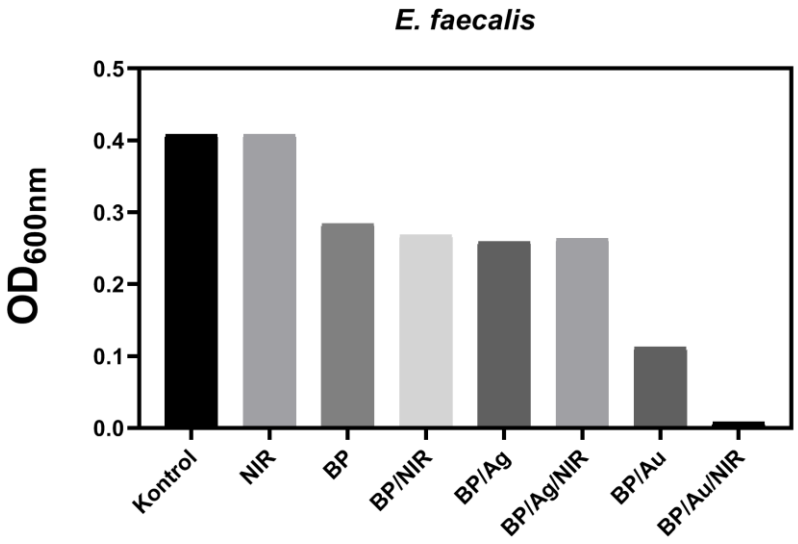
Şekil 4.15. Farklı konsantrasyonlardaki BPAg'nin (32, 64, 128 µg/ml) *E. faecalis* büyüme eğrisi üzerine etkileri

Şekil 4.16'da ilk 8 saat boyunca malzemelerin bakteri büyümesine olan etkileri; Şekil 4.17'de ise örneklerin 24 saat sonundaki OD_{600nm} değerleri gösterilmektedir.

Sonuç olarak BP/Au malzemesinin *E. faecalis* üzerindeki antibakteriyel etkisinin aynı konsantrasyondaki BP ve BP/Ag malzemelerine göre daha fazla olduğu ve hatta 128 µg/ml'de NIR ışınlaması yapıldığında bakteri büyümesini 24 saat boyunca inhibe edebildiği gözlenmiştir.



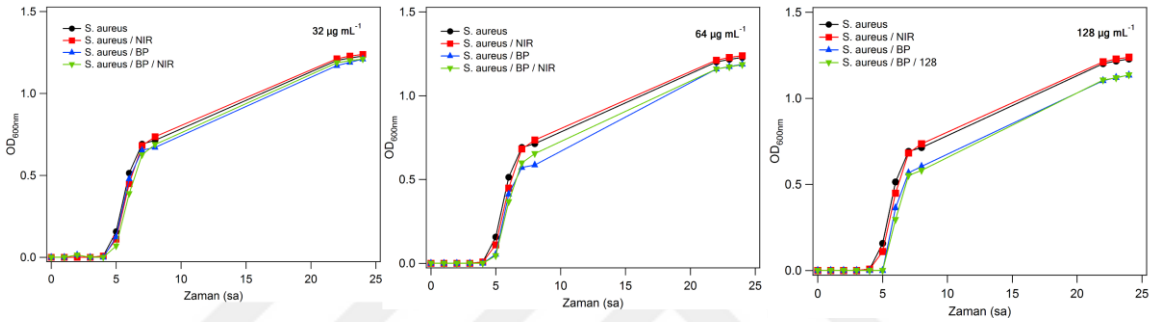
Şekil 4.16. BP, BP/Ag ve BP/Au (128 µg/ml) ile muamele edilen *E. faecalis* suşunun 8 saatlik büyüme eğrisi



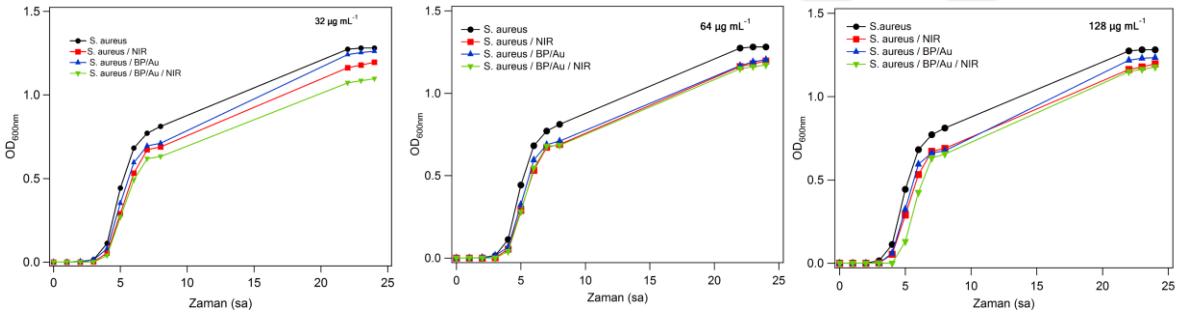
Şekil 4.17. BP, BP/Ag ve BP/Au (128 µg/ml) ile muamele edilen *E. faecalis* örneklerinin 24 saat sonundaki OD_{600nm} değerleri

4.2.2.3. *Staphylococcus aureus*

Şekil 4.18'de üç farklı konsantrasyondaki (32, 64 ve 128 µg/ml) siyah fosfor nanotabakalarının *S. aureus* bakterisinin büyümesine olan etkisi grafik olarak verilmiştir. Sadece lazer ışığının (NIR, ƛ=808 nm, 1 W cm^{-2}) *S. aureus* suşu üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Şekil 4.18'de NIR ışınlaması olduğunda veya olmadığında 32 ve 64 µg/ml BP muamelesinden sonra, bakterilerin optik yoğunluğunda kontrol grubu ile neredeyse hiç fark olmadığı görülmektedir. 128 µg/ml'da ise çok az da olsa OD_{600nm} değerlerinde kontrol grubuna göre azalma gözlenmiştir. BP/Au malzemesi de aynı şekilde bakteri üremesinde bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

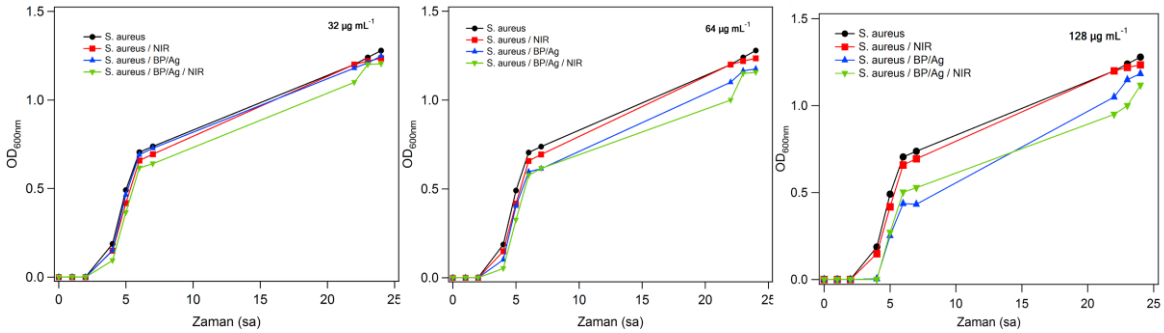


Şekil 4.18. Farklı konsantrasyonlardaki BP'nin (32, 64, 128 µg/ml) *S. aureus* büyüme eğrisi üzerine etkileri



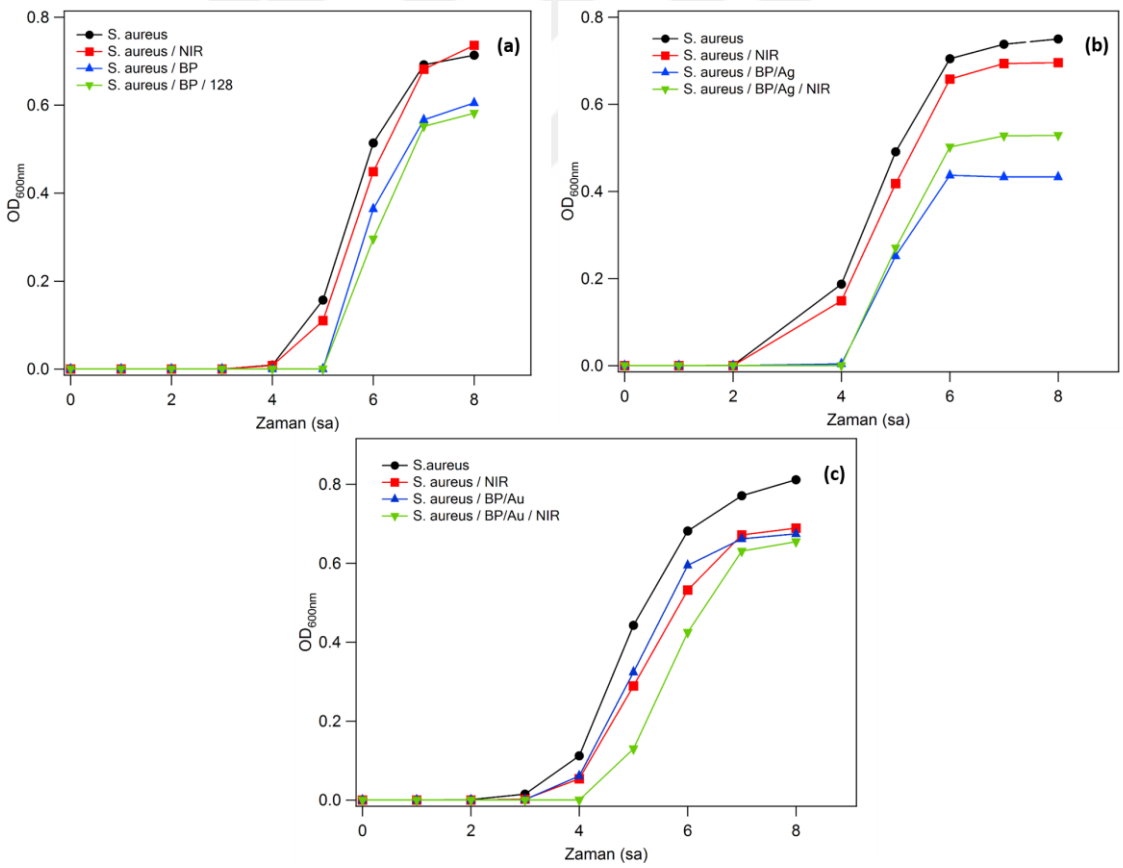
Şekil 4.19. Farklı konsantrasyonlardaki BPAu'nun (32, 64, 128 µg/ml) *S. aureus* büyüme eğrisi üzerine etkileri

BP/Ag malzemesi 32 ve 64 µg/ml'de bakteri üremesinde belirgin bir etki gösterememiştir. 128 µg/ml'de ise üremenin ilk dört saatinde bakteriyostatik bir etki gösterebildiği fakat bu süreden sonra üremenin logaritmik bir şekilde devam ettiği görülmektedir.

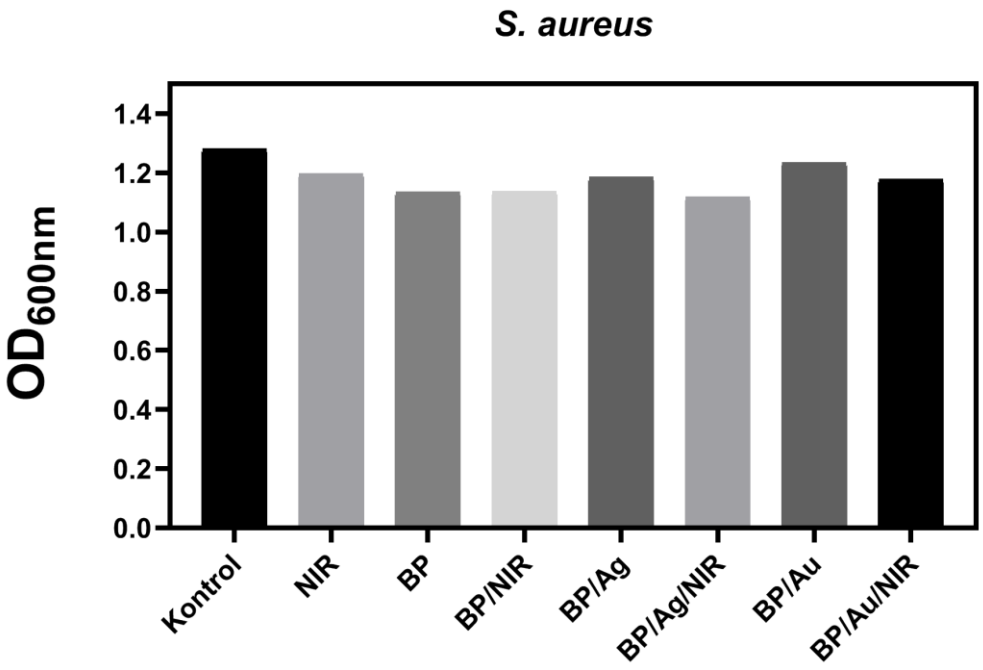


Şekil 4.20. Farklı konsantrasyonlardaki BPAg'nin (32, 64, 128 µg/ml) *S. aureus* büyüme eğrisi üzerine etkileri

Şekil 4.21'de ilk 8 saat boyunca malzemelerin bakteri büyümesine olan etkileri; Şekil 4.22'de ise örneklerin 24 saat sonundaki OD_{600nm} değerleri gösterilmektedir. İlk 8 saatteki büyüme eğrilerine bakıldığında BP/Ag nanohibriti ile muamele edilen *S. aureus* bakterilerinin büyümesi belirgin bir şekilde azaltılmıştır. Ancak 8 saat sonra bu etki kaybolmuştur. Sonuç olarak BP, BP/Au ve BP/Ag maddelerinin *S. aureus* suşu üzerinde etkin bir aktibakteriyel aktivite gösteremediği görülmüştür.



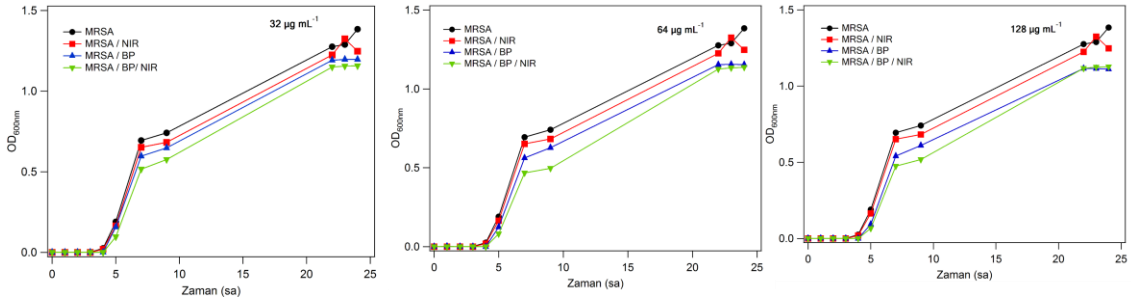
Şekil 4.21. BP, BP/Ag ve BP/Au (128 µg/ml) ile muamele edilen *S. aureus* suşunun 8 saatlik büyüme eğrisi



Şekil 4.22. BP, BP/Ag ve BP/Au (128 µg/ml) ile muamele edilen *S. aureus* örneklerinin 24 saat sonundaki OD_{600nm} değerleri

4.2.2.4. Metisiline Dirençli *Staphylocccus aureus*

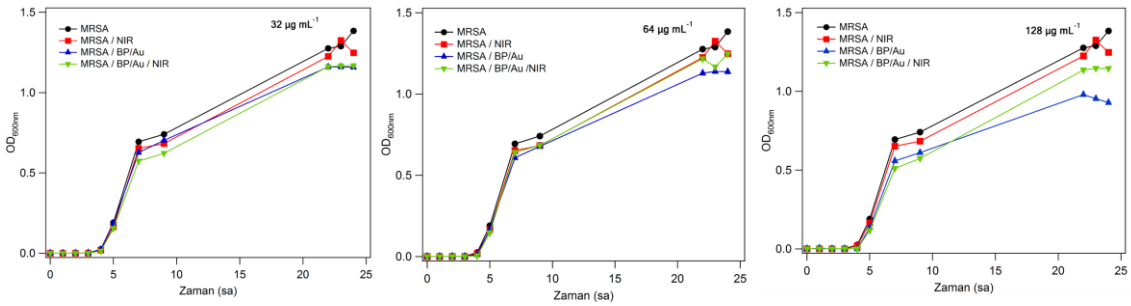
Şekil 4.23'te üç farklı konsantrasyondaki (32, 64 ve 128 µg/ml) siyah fosfor nanotabakalarının MRSA bakterisinin büyümesine olan etkisi grafik olarak verilmiştir. Lazer ışığının (NIR, ƛ=808 nm, 1 W cm^{-2}) tek başına MRSA üremesi üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı görülmektedir. MRSA büyüme eğrisine bakıldığında logaritmik evreye çok geç girdiği belirlenmiştir. Şekil 4.23'te NIR ışınlaması olduğunda veya olmadığında 32, 64 ve 128 µg/ml BP muamelesinden sonra, bakterilerin optik yoğunluğunda kontrol grubu ile neredeyse hiç fark olmadığı görülmektedir.



Şekil 4.23. Farklı konsantrasyonlardaki BP'nin (32, 64, 128 µg/ml) MRSA büyüme eğrisi üzerine etkileri

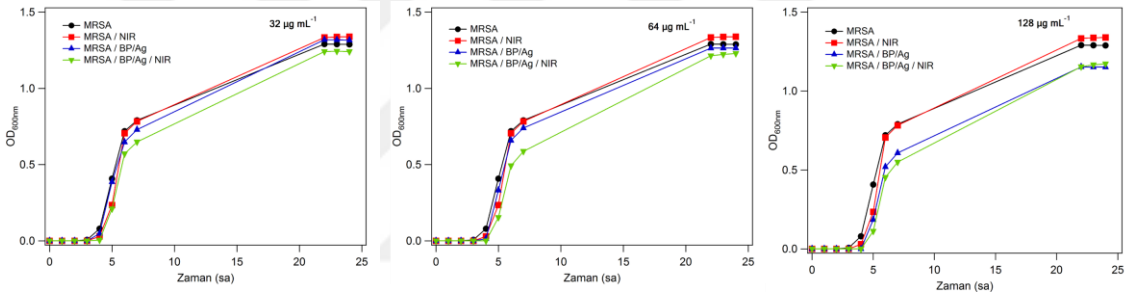
BP/Ag malzemesi 32 ve 64 µg/ml'de bakteri üremesinde belirgin bir etki gösterememiştir. 128 µg/ml'de ise BP/Ag ile büyütülen bakterilerin OD değerleri

kontrol grubuna göre biraz daha düşüktür; ancak bu antibakteriyel etkiden bahsetmek için yetersiz bir veridir.



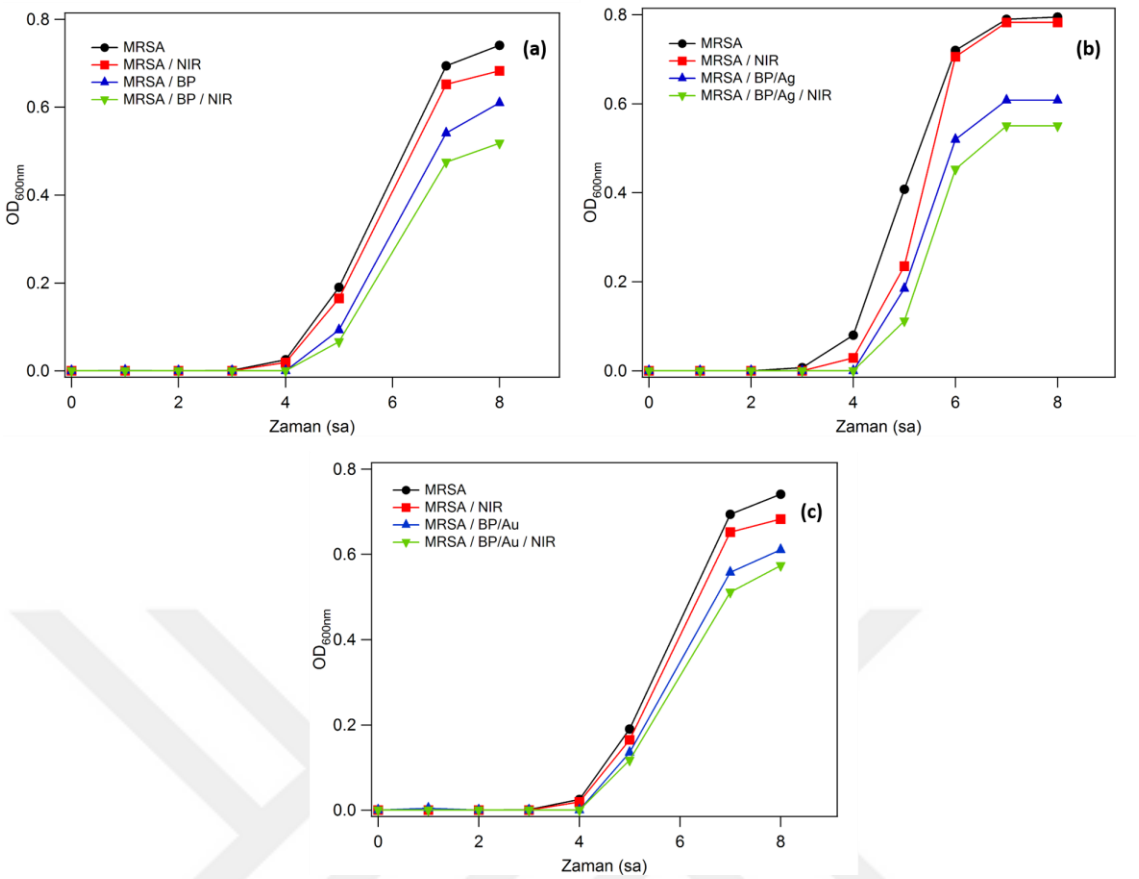
Şekil 4.24. Farklı konsantrasyonlardaki BPAu'nun (32, 64, 128 µg/ml) MRSA büyüme eğrisi üzerine etkileri

BP/Au üç konsantrasyonda da bakteri üremesini yavaşlatıcı bir etki gösterememiştir. Şekil 4.24'te görüldüğü üzere 128 µg/ml'de az da olsa OD değerinde bir azalma meydana gelmiştir.

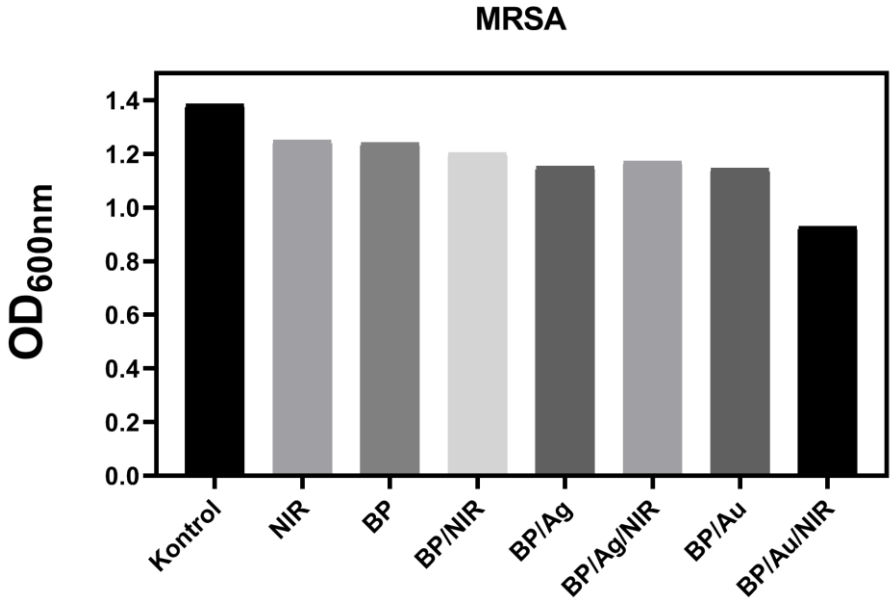


Şekil 4.25. Farklı konsantrasyonlardaki BPAg'nin (32, 64, 128 µg/ml) MRSA büyüme eğrisi üzerine etkileri

Şekil 4.26'da ilk 8 saat boyunca malzemelerin bakteri büyümesine olan etkileri; Şekil 4.27'de ise örneklerin 24 saat sonundaki OD_{600nm} değerleri gösterilmektedir. İlk 8 saatteki büyüme eğrilerine bakıldığında BP/Ag nanohibriti ile muamele edilen MRSA bakterilerinin büyümesi *S. aureus*'da olduğu gibi belirgin bir şekilde azaltılmıştır. Ancak 8 saat sonra bu etki kaybolmuştur. Sonuç olarak BP, BP/Au ve BP/Ag maddelerinin MRSA suşu üzerinde etkin bir aktibakteriyel aktivite gösteremediği görülmüştür.



Şekil 4.26. BP, BP/Ag ve BP/Au (128 µg/ml) ile muamele edilen *MRSA* suşunun 8 saatlik büyüme eğrisi



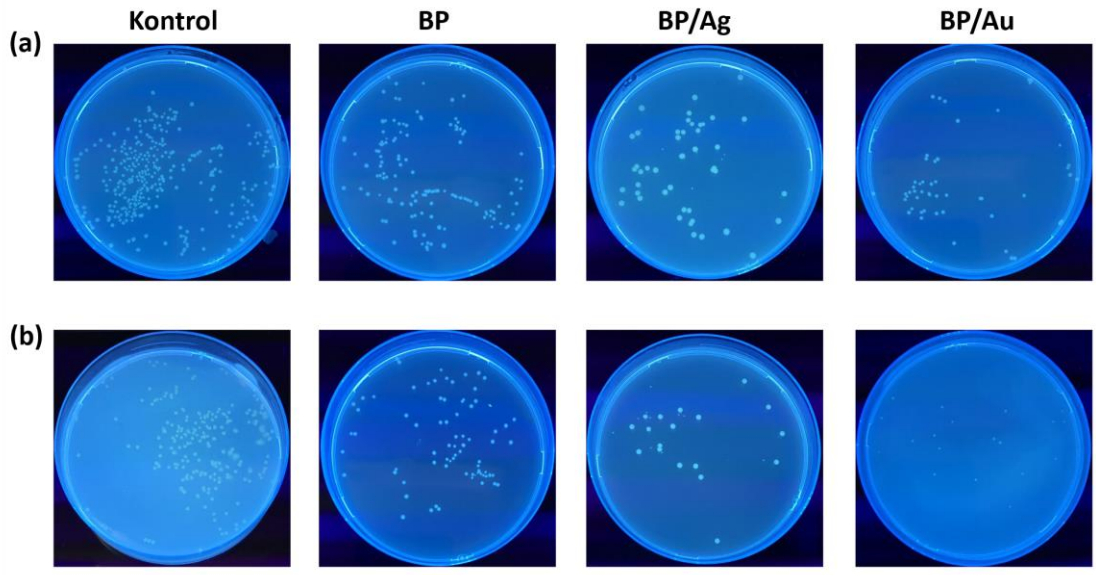
Şekil 4.27. BP, BP/Ag ve BP/Au (128 µg/ml) ile muamele edilen MRSA örneklerinin 24 saat sonundaki OD_{600nm} değerleri

4.2.3. Koloni Sayımı Sonuçları

4-6 saatlik inkübasyon sonrası petride oluşan bakteri kolonileri sayılıp sağ kalım oranları (%) hesaplanarak BP, BP/Ag ve BP/Au maddelerinin antibakteriyel aktiviteleri incelenmiştir.

4.2.3.1. *Escherichia coli*

E. coli suşunun farklı muamelelerden sonraki petri görüntüleri Şekil 4.28'de gösterilmektedir. Şekil 4.29'da ise her bir örnekteki koloni sayıları ve bakteri sağ kalım oranları bulunmaktadır. Herhangi bir malzeme ile muamele edilmeyip sadece 5 dk boyunca NIR ışığına maruz bırakılan *E. coli* petrisinde bakteri sağ kalım oranı %74 olarak hesaplanırken; BP, BP/Ag ve BP/Au'ya maruz bırakılan örneklerde sırasıyla sağ kalım oranları %44, %17 ve %17 olarak hesaplanmıştır. Buna karşılık BP, BP/Ag ve BP/Au'nun NIR ışığına maruz bırakıldığı örneklerdeki sağ kalım oranları ise sırasıyla %26, %10 ve %6 olarak hesaplanmıştır.

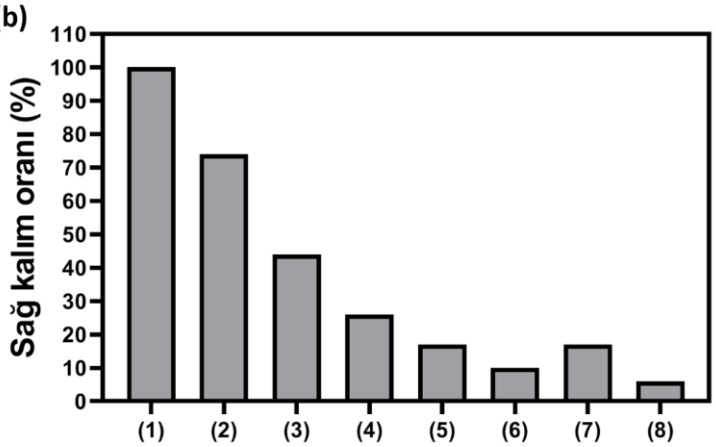


Şekil 4.28. BP, BP/Ag ve BP/Au (128 µg/ml) ile muamele edilen *E. coli* suşunun (a) NIR ışığı yokluğunda ve (b) NIR ışığı varlığındaki petri görüntüleri

(a)

Örnek	Koloni sayısı
(1)	300
(2)	221
(3)	133
(4)	77
(5)	50
(6)	30
(7)	51
(8)	30

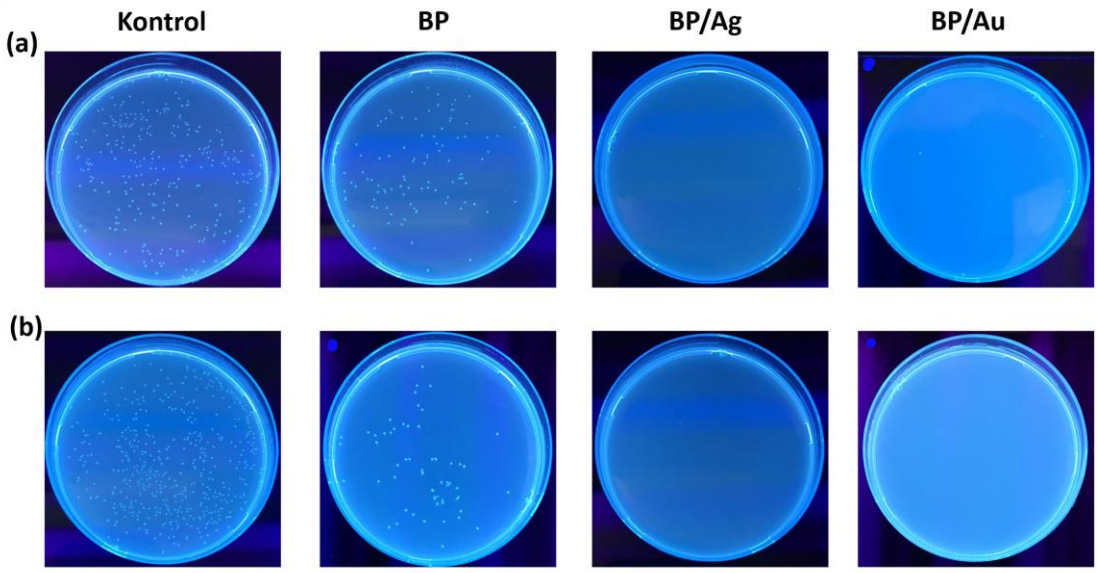
(b)



Şekil 4.29. *E. coli* örneklerinin (a) koloni sayıları ve buna bağlı olarak hesaplanan (b) sağ kalım oranları. (1) Kontrol; (2) NIR; (3) BP; (4) BP/NIR; (5) BP/Ag; (6) BP/Ag/NIR; (7) BP/Au; (8) BP/Au/NIR

4.2.3.2. *Enterococcus faecalis*

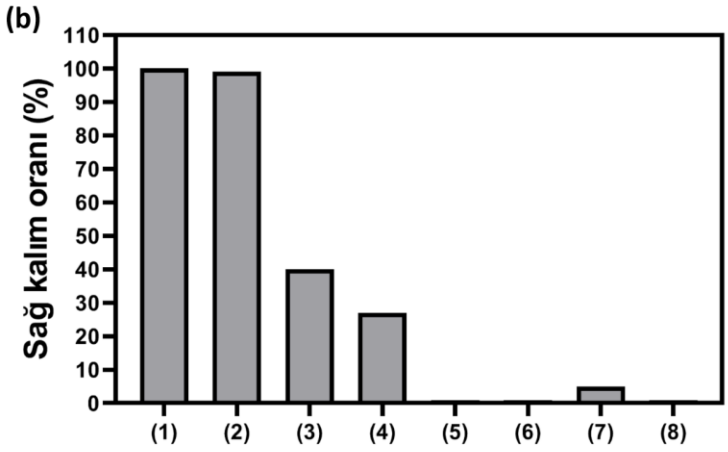
E. faecalis suşunun farklı muamelelerden sonraki petri görüntüleri Şekil 4.30'da gösterilmektedir. Şekil 4.31'de ise her bir örnekteki koloni sayıları ve bakteri sağ kalım oranları bulunmaktadır. Herhangi bir malzeme ile muamele edilmeyip sadece 5 dk boyunca NIR ışığına maruz bırakılan *E. faecalis* petrisinde bakteri sağ kalım oranı %99 olarak hesaplanırken; BP ve BP/Au'ya maruz bırakılan örneklerde sırasıyla sağ kalım oranları %40 ve %5 olarak hesaplanmıştır. BP/Ag'ye maruz bırakılan örneğin petrisinde ise hiç koloni oluşmadığı görülmektedir. BP malzemesinin NIR ışığına maruz bırakıldığı örneklerdeki sağ kalım oranı ise %27 olarak hesaplanmıştır. BP/Ag ve BP/Au maddelerinin NIR ışınlaması altındaki muamelesinden sonra petrilerde koloni oluşumu gözlenmemiştir.



Şekil 4.30. BP, BP/Ag ve BP/Au (128 µg/ml) ile muamele edilen *E. faecalis* suşunun (a) NIR ışığı yokluğunda ve (b) NIR ışığı varlığındaki petri görüntüleri

(a)

Örnek	Koloni sayısı
(1)	268
(2)	266
(3)	108
(4)	72
(5)	0
(6)	0
(7)	5
(8)	0

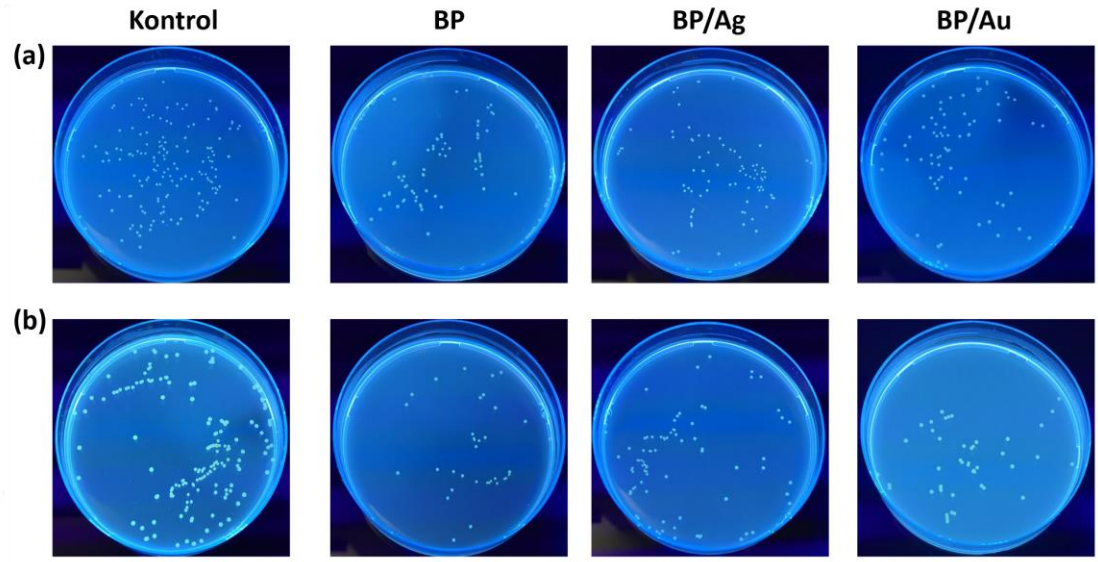


Şekil 4.31. *E. faecalis* örneklerinin (a) koloni sayıları ve buna bağlı olarak hesaplanan (b) sağ kalım oranları. (1) Kontrol; (2) NIR; (3) BP; (4) BP/NIR; (5) BP/Ag; (6) BP/Ag/NIR; (7) BP/Au; (8) BP/Au/NIR

4.2.3.3. *Staphylococcus aureus*

S. aureus suşunun farklı muamelelerden sonraki petri görüntüleri Şekil 4.32'de gösterilmektedir. Şekil 4.33'te ise her bir örnekteki koloni sayıları ve bakteri sağ kalım oranları bulunmaktadır. Herhangi bir malzeme ile muamele edilmeyip sadece 5 dk boyunca NIR ışığına maruz bırakılan *S. aureus* petrisinde bakteri sağ kalım oranı %99 olarak hesaplanırken; BP, BP/Ag ve BP/Au'ya maruz bırakılan örneklerde sırasıyla sağ kalım oranları %45, %55 ve %47 olarak hesaplanmıştır. Buna karşılık BP, BP/Ag ve

BP/Au'nun NIR ışığına maruz bırakıldığı örneklerdeki sağ kalım oranları ise sırasıyla %22, %52 ve %31 olarak hesaplanmıştır.

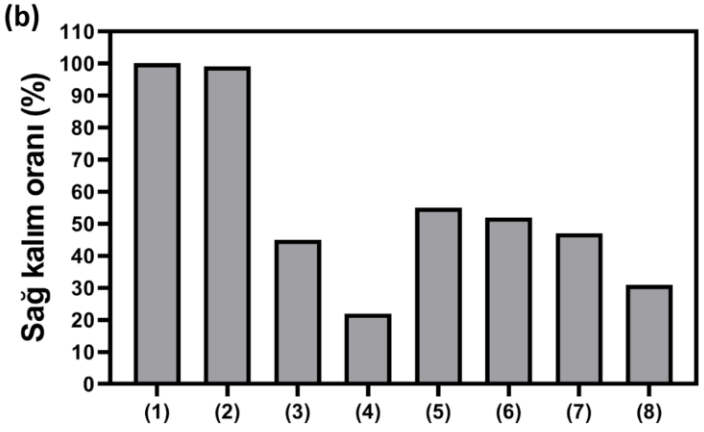


Şekil 4.32. BP, BP/Ag ve BP/Au (128 µg/ml) ile muamele edilen *S. aureus* suşunun (a) NIR ışığı yokluğunda ve (b) NIR ışığı varlığındaki petri görüntüleri

(a)

Örnek	Koloni sayısı
(1)	154
(2)	152
(3)	70
(4)	34
(5)	84
(6)	80
(7)	73
(8)	47

(b)

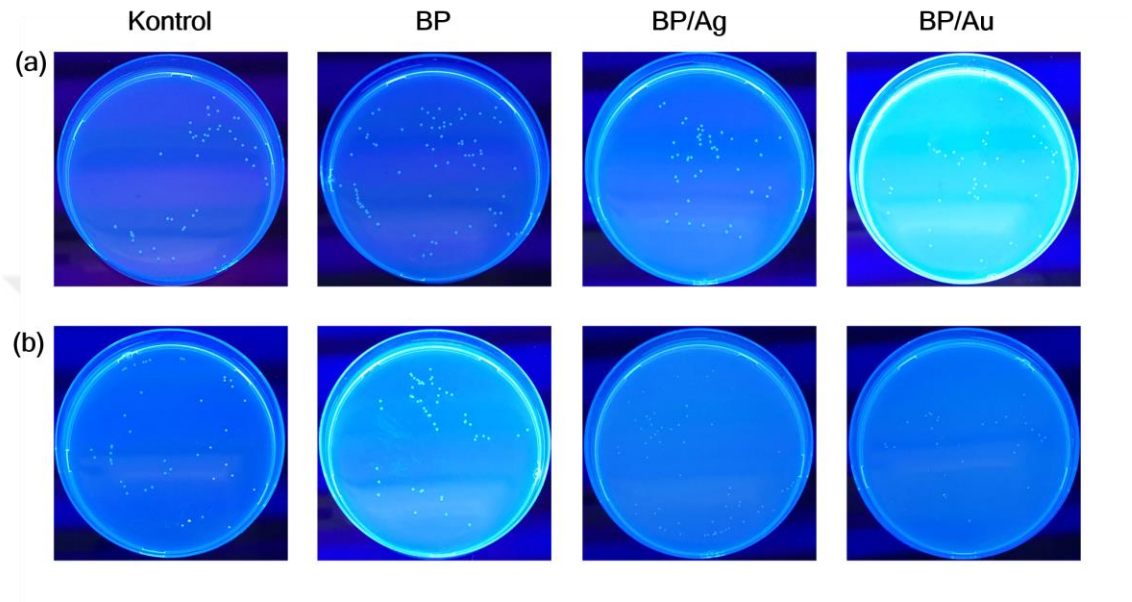


Şekil 4.33. *S. aureus* örneklerinin sağ kalım oranları. (1) Kontrol; (2) NIR; (3) BP; (4) BP/NIR; (5) BP/Ag; (6) BP/Ag/NIR; (7) BP/Au; (8) BP/Au/NIR.

4.2.3.4. Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*

MRSA suşunun farklı muamelelerden sonraki petri görüntüleri Şekil 4.34'te gösterilmektedir. Şekil 4.35'te ise her bir örnekteki koloni sayıları ve bakteri sağ kalım oranları bulunmaktadır. Herhangi bir malzeme ile muamele edilmeyip sadece 5 dk boyunca NIR ışığına maruz bırakılan MRSA petrisinde bakteri sağ kalım oranı %97.8 'dir. BP ve BP/Au malzemeleri tek başına veya NIR ışık altında koloni sayılarında bir

azaltma yapmamıştır. BP/Ag malzemesi tek başına muamele edildiğinde bakteri sağ kalım oranını %91.3'e düşürürken; NIR ışık altında sağ kalım oranı %58'e düşmüştür (Şekil 34(b) ve Şekil 35(b)). Burada BP/Ag maddesinin MRSA üzerindeki antibakteriyel aktivitesinin BP/Au'ya göre çok daha yüksek olduğu açıkça görülmektedir.

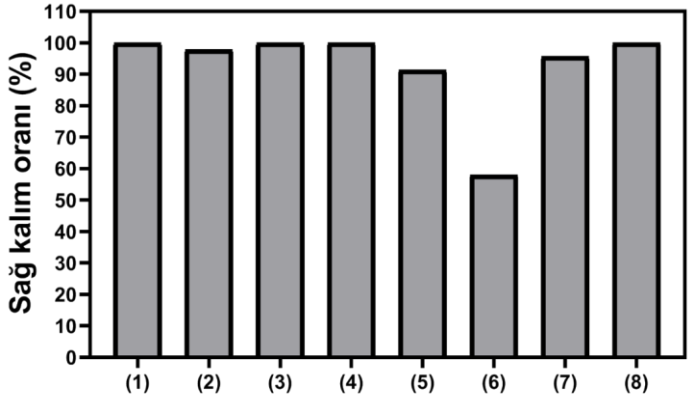


Şekil 4.34. BP, BP/Ag ve BP/Au (128 µg/ml) ile muamele edilen MRSA suşunun (a) NIR ışığı yokluğunda ve (b) NIR ışığı varlığındaki petri görüntüleri

(a)

Örnek	Koloni Sayısı
(1)	46
(2)	45
(3)	>46
(4)	>46
(5)	42
(6)	27
(7)	44
(8)	>46

(b)



Şekil 4.35. MRSA örneklerinin sağ kalım oranları. (1) Kontrol; (2) NIR; (3) BP; (4) BP/NIR; (5) BP/Ag; (6) BP/Ag/NIR; (7) BP/Au; (8) BP/Au/NIR.

4.2.4. Floresan Mikroskopisi Sonuçları

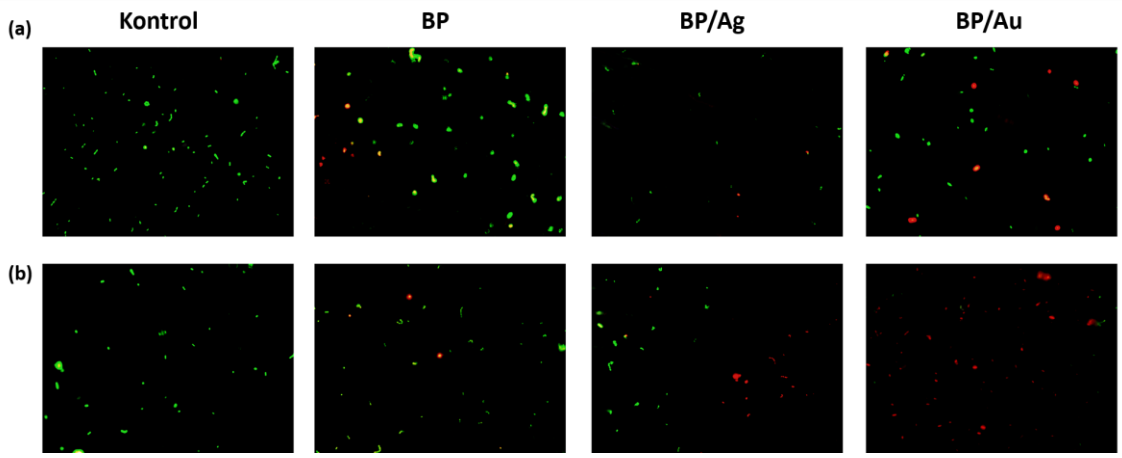
Nanobıçak etkisi olarak adlandırılan bakteriyel membran tahribatı 2 boyutlu nanomalzemelerin antibakteriyel aktivitesinde önemli bir mekanizmadır.(Zou ve ark.,

2016a; Xiong ve ark., 2018b; Miao ve ark., 2019b). Bu bağlamda bu tez çalışmasında BP, BP/Ag ve BP/Au nanomalzemelerinin antibakteriyel etki mekanizmalarını belirlemek için bakteri membran bütünlüğü floresan mikroskobunda Live-Dead boyama kitiyle incelenmiştir. Kit içerisinde bulunan SYTO-9 membran bütünlüğünü koruyan canlı hücrelerin DNA'sına bağlanıp yeşil floresan verirken; Propidyum iyodür membranı hasar görmüş ölü bakterilerin DNA'sına bağlanarak kırmızı floresans yaymaktadır. Böylece bu teknikle örnekteki canlı (membran bütünlüğü bozulmayan) ve ölü (membran bütünlüğü bozulan) bakteriler hakkında yorum yapılabilmektedir.

Her bir malzeme 128 µg/ml konsantrasyonda hazırlanarak belirli yoğunluktaki bakteri kültürü ile muamele edilip 37 °C'de 3 saat inkübe edildikten sonra bir floresan boyama kiti kullanılarak boyanıp mikroskopta görüntüleri kaydedilmiştir.

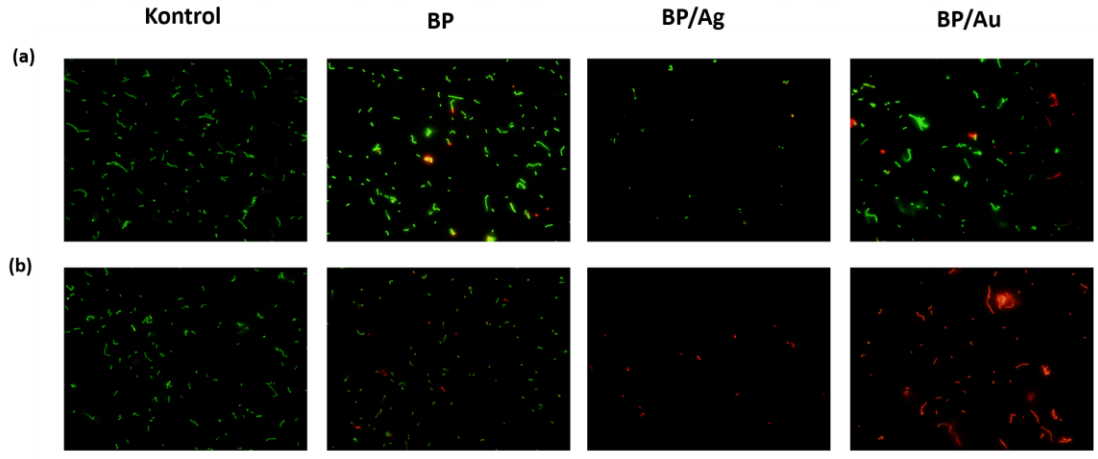
4.2.4.1. BP, BP/Ag ve BP/Au malzemelerinin *Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus ve* Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşları Üzerindeki Antibakteriyel Etkilerinin Floresan Mikroskobunda İncelenmesi

NIR (808 nm, 1 W cm^{-2}) ışık ışınlamasına 5 dakika maruz kaldıktan sonra, hemen hemen tüm bakterilerin membran yapılarının bütünlüğünü koruyarak yeşil floresan verdiği görülmektedir. BP ve BP/Ag ile maruz bırakılan NIR ışığı varlığında ve yokluğunda *E. coli* bakterilerin az bir kısmının kırmızı floresan verdiği görülmektedir. Şekil 4.35(a)'da görüldüğü üzere BP/Au tek başına muamele edildiğinde BP ve BP/Ag'den daha etkili olmuştur. BPAu NIR ışımasıyla birlikte muamele edildiğinde ise örnekteki tüm hücrelerin membran bütünlüğünün bozulduğu ve buna bağlı olarak kırmızı floresan yaydığı Şekil 4.35 (b)'de görülmektedir.



Şekil 4.35. BP, BP/Ag ve BP/Au ile muamele edilen *E. coli* suşunun (a) NIR ışığı yokluğu ve (b) NIR ışığı varlığında (808 nm, 1 W/cm^2) çekilen floresan görüntüleri

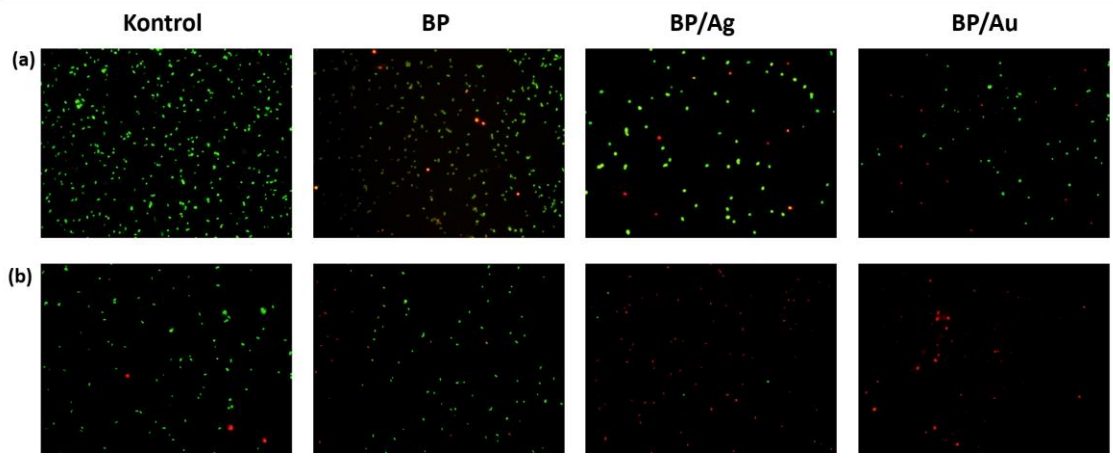
Şekil 4.36'da *E. faecalis* suşunun farklı muamelelerden sonraki floresan görüntüleri yer almaktadır. Yalnız NIR ışığında bekletilen bakterilerde herhangi bir tahribat söz konusu olmamıştır. BP örnekleri de kayda değer bir kırmızı floresan vermemiştir. Ancak NIR ışıması altında BP/Ag ve BP/Au malzemeleri ile muamele edilen *E. faecalis*'in tamamının membran bütünlüğü bozulup kırmızı floresan verdiği gözlenmiştir.



Şekil 4.36. BP, BP/Ag ve BP/Au ile muamele edilen *E. faecalis* suşunun (a) NIR ışığı yokluğu ve (b) NIR ışığı varlığında (808 nm, 1 W/cm^2) çekilen floresan görüntüleri

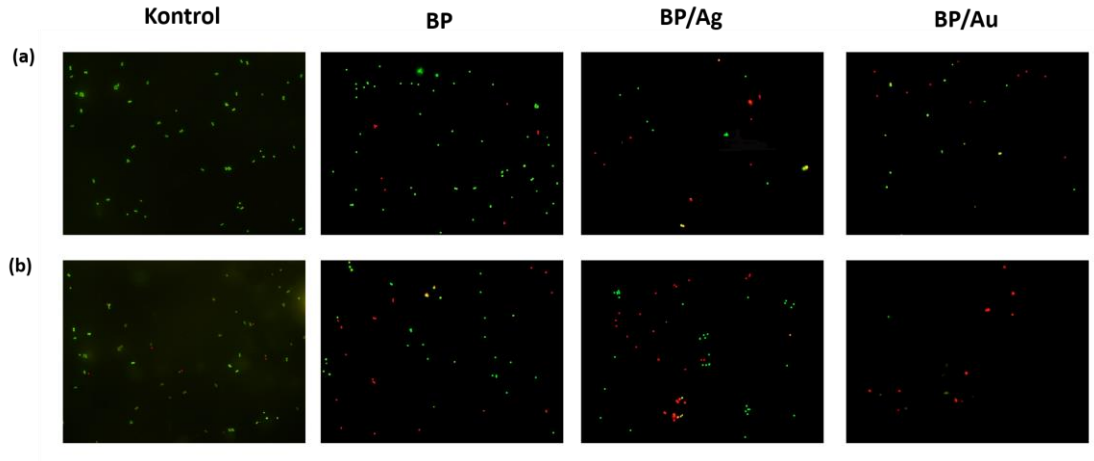
Şekil 4.37 (b)'de NIR ışığında bekletilen *S. aureus* bakterilerinin çok azında tahribat meydana geldiği görülmektedir. BP örnekleri de kayda değer bir kırmızı floresan vermemiştir. NIR ışıması altında BP/Ag ile muamele edilen *S. aureus* bakterilerinde ciddi bir membran hasarı meydana gelirken; BP/Au ile muamele edilen

örnekteki tüm bakterilerin membran bütünlüğü bozulup kırmızı floresan verdiği gözlenmiştir.



Şekil 4.37. BP, BP/Ag ve BP/Au ile muamele edilen *S. aureus* suşunun (a) NIR ışığı yokluğu ve (b) NIR ışığı varlığında (808 nm, 1 W/cm^2) çekilen floresan görüntüleri

Şekil 4.38(b)'de NIR ışığında bekletilen MRSA bakterileri yeşil floresan vermiştir. BP örnekleri de kayda değer bir kırmızı floresan vermemiştir. NIR ışıması altında BP/Ag ve BP/Au ile muamele edilen MRSA bakterilerinin çoğunda membran hasarı meydana gelmiş olmasına rağmen tüm bakterilerde yeterince etkili olmadıkları gözlenmiştir.



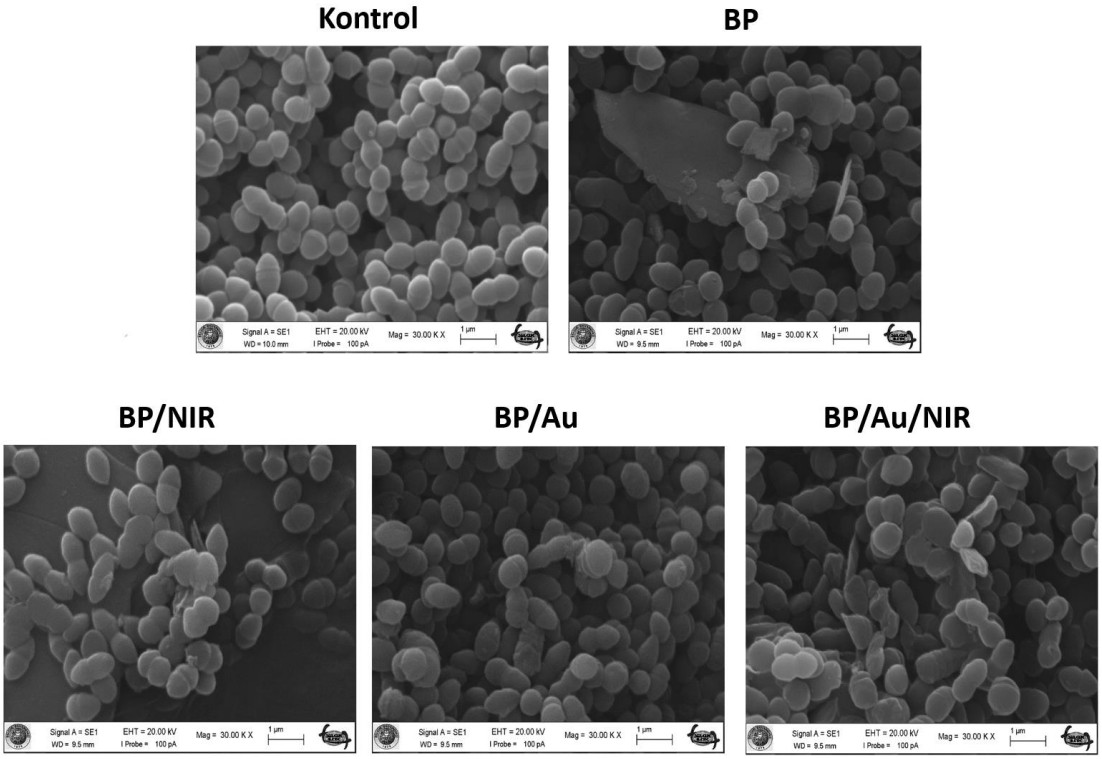
Şekil 4.38. BP, BP/Ag ve BP/Au ile muamele edilen MRSA suşunun (a) NIR ışığı yokluğu ve (b) NIR ışığı varlığında (808 nm, 1 W/cm^2) çekilen floresan görüntüleri

4.2.5. SEM Görüntüleri

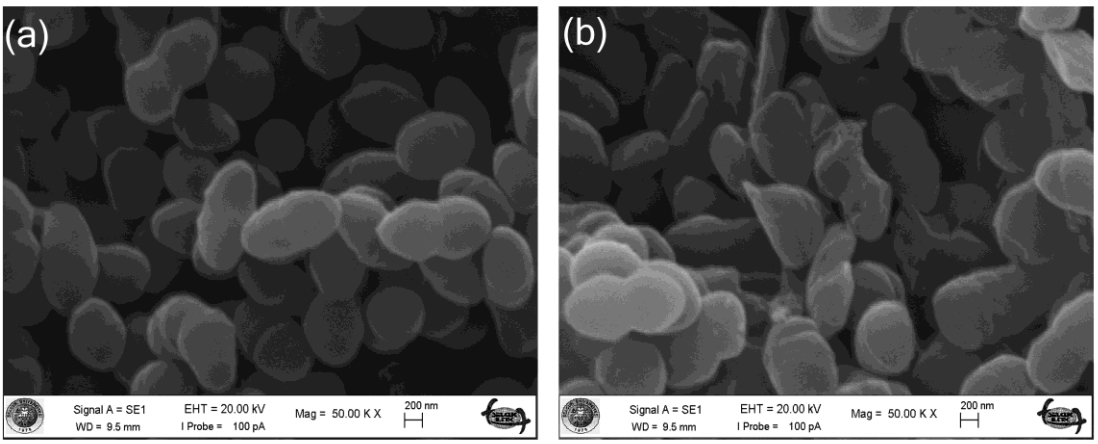
OD ve petri sonuçlarına göre BP/Au maddesi *E. faecalis* suşunun üremesini tamamen engelleyerek yüksek bir antibakteriyel aktivite göstermiştir. BP ve BP/Au

nanomalzemelerinin bakteri morfolojisine olan etkisini anlayabilmek için SEM görüntüleri çekilmiştir.

Şekil 4.39'daki SEM görüntülerine bakıldığında; hiçbir madde ile muamele edilmeyen örnekte pürüzsüz yüzeyli tipik bir *E. faecalis* morfolojisi görülmektedir. BP nanotabakalarının bakteri yüzeylerine tutunarak bakterilerin bir kısmında morfoloji bozukluğu oluşturduğu tespit edilmiştir. BP/Au nanohibridinin ise bakterilerin zarında yüzey çökmesi ve büzüşme gibi tahribatlar meydana getirdiği gözlenmektedir. Şekil 4.40'ta ise BP/Au'nun nanobıçak etkisi daha ayrıntılı bir şekilde görülmektedir.



Şekil 4.39. NIR ışık varlığında ve yokluğunda farklı nanomalzemeler ile muamele edilen *E. faecalis*'in SEM görüntüleri (Ölçek çubukları 1 µm'dir.)



Şekil 4.40. (a) Normal *E. faecalis* ve (b) NIR ışığı altında BP/Au ile muamele edilen *E. faecalis* morfolojileri (Ölçek çubukları 200 nm'dir.)

4.2.6. Oksidatif Stres Analizi Sonuçları

Nanomalzemelerin sahip olduğu antibakteriyel etkinliğin ROS üretimi ile gerçekleşen oksidatif stres mekanizması ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu tez çalışmasında kullanılan BP, BP/Ag ve BP/Au malzemelerinin neden olduğu oksidatif stres GSH kaybı ölçülerek belirlenmiştir. Kaybedilen GSH miktarının ölçülmesi için öncelikle bir GSH standardı hazırlanmıştır. 0-400 µM GSH aralığında 405 nm'de ölçülen absorbans değerleri Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. 0-400 µM GSH aralığında 405 nm'de ölçülen absorbans değerleri

GSH (µM)	A_{405nm}	GSH (µM)	A_{405nm}
10	0.063	**210**	0.944
20	0.130	**220**	1.087
30	0.191	**230**	1.090
40	0.247	**240**	1.200
50	0.303	**250**	1.340
60	0.367	**260**	1.480
70	0.409	**270**	1.600
80	0.511	**280**	1.629
90	0.527	**290**	1.783
100	0.652	**300**	1.808
110	0.675	**310**	1.734
120	0.700	**320**	1.790
130	0.752	**330**	1.795
140	0.780	**340**	1.730
150	0.800	**350**	1.753
160	0.807	**360**	1.782
170	0.850	**370**	1.764
180	0.860	**380**	1.756
190	0.912	**390**	1.789
200	0.930	**400**	1.779

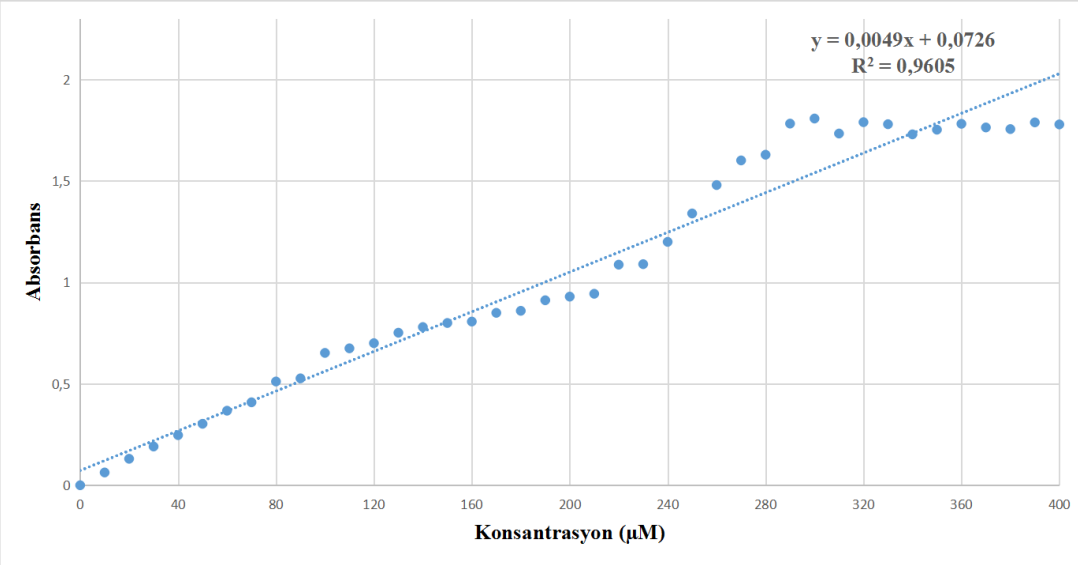
Tabloda verilen absorbans değerlerine göre elde edilen standart eğri Şekil 4.41'de görülmektedir. Bu grafiğe göre çıkan denklem y = 0.0049x + 0.0726 olmuştur. Deneyde inkübasyon sonunda kalan GSH miktarının ölçülmesi için bu denklem kullanılmıştır. Burada x ekseni konsantrasyonu, y ekseni ise absorbans değerini ifade etmektedir. Örneğin; 405 nm'de ölçülen GSH absorbansı 0.5 olduğunda konsantrasyon aşağıdaki gibi hesaplanır;

$y = 0.0049x + 0.0726$

$0.5 = 0.0049x + 0.0726$

0.5 - 0.0726 = 0.0049x

x = 87.2 µM (GSH konsantrasyonu).

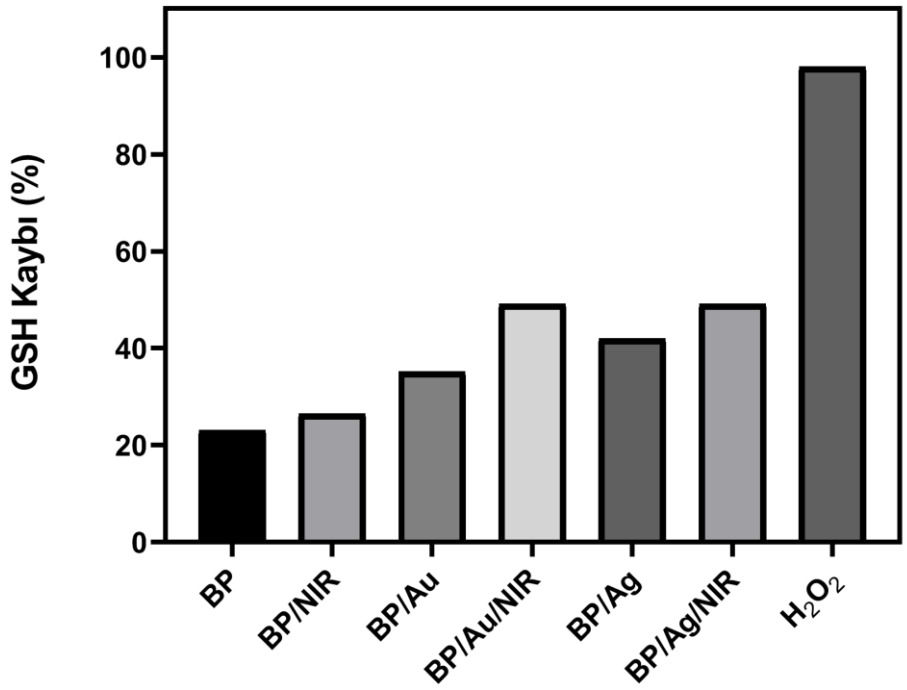


Şekil 4.41. 0-400 µM aralığındaki GSH örneklerinin 405 nm'deki standart eğrisi

GSH tükenme deneyi sonucunda ölçülen absorbans değerlerinin ortalamaları, standart eğri denklemine göre hesaplanan GSH miktarları ve GSH kayıp oranları Çizelge 4.3'te görülmektedir. Burada H_2O_2 bir peroksit olduğu için GSH ile reaksiyona girerek neredeyse tüm GSH'ı tüketmiştir (%98). Tek başına BP nanotabakalarının GSH miktarını %23.1 oranında; ışık etkisinde ise %26.5 oranında azalttığı görülmektedir. Tek başına BP/Au nanokompoziti GSH miktarını %35.1 oranında; ışık etkisinde ise %49.1 oranında azaltırken, BP/Ag nanokompoziti tek başına %42; ışık etkisinde ise %49.1 oranında azaltmaktadır. Şekil 4.42'de bu oranların bar grafiği gösterilmektedir.

Çizelge 4.3. GSH tükenme deneyi sonucunda ölçülen absorbans değerleri ($p<0.05$), standart eğri denklemine göre hesaplanan GSH miktarları ve GSH kayıp oranları

Deney grupları	**GSH (PK)**	**BP**	**BP/NIR**	**BP/Au**	**BP/Au/NIR**	**BP/Ag**	**BP/Ag/NIR**	**H_2O_2 (NK)**
Absorbans	1.5	1.17	1.12	1	0.8	0.9	0.8	0.1
GSH miktarı (µM)	291.3	224	214	189	148	169	148	5.6
GSH Kaybı (%)	0	23.1	26.5	35.1	49.1	42	49.1	98



Şekil 4.42. Malzemelerin karanlık ve NIR ışık altındaki muamelelerinden sonraki GSH kayıp yüzdeleri

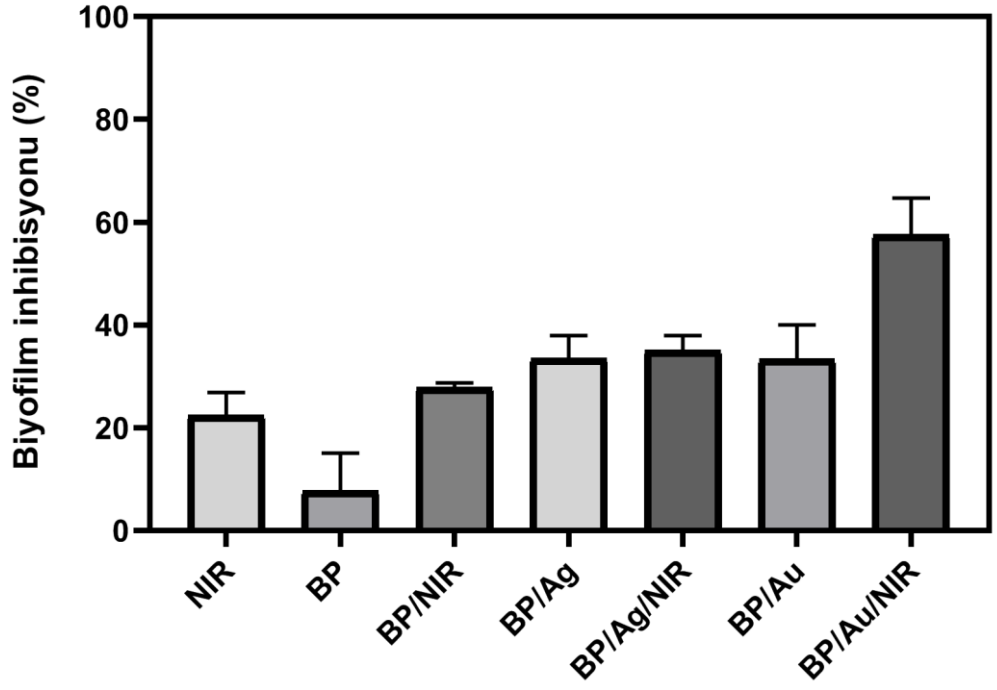
4.3. BP, BP-Au ve BP-Ag Nanomalzemelerinin Antibiyofilm Aktivitesi

Biyofilmler, canlı dokular, implantlar veya tıbbi cihazların yüzeylerinde oluşup insan sağlığını tehdit ederek antibiyotik direncine ve kalıcı enfeksiyonlara neden olur. Biyofilm oluşumunun önlenmesi veya giderilmesi için klasik yöntemlere alternatif bir yaklaşım olarak, sahip oldukları üstün fizyokimyasal özellikleri nedeniyle nanomalzemelerin kullanıldığı birçok çalışma yapılmıştır.

4.3.1. BP, BP-Au ve BP-Ag Nanomalzemelerinin *Enterococcus faecalis* Bakterisinin Oluşturduğu Biyofilm Üzerindeki İnhibisyon Etkisi

Bu çalışmada, BP, BP/Au ve BP/Ag malzemelerinin 64 µg/ml konsantrasyonda NIR ışığı varlığında/yokluğunda *E. feacalis* biyofilm oluşumunun üzerindeki inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Malzemelerin antibiyofilm aktiviteleri kristal viyole boyama-mikrotitrasyon tekniği kullanılarak bulunmuştur. Şekil 4.43 malzemelerin ışıklı/ışıksız ortamdaki biyofilm inhibisyon oranlarını gösteren bir bar grafiğidir. Yalnızca NIR ışığının %22 oranında *E. faecalis* biyofilmini inhibe ettiği gözlenmiştir. BP maddesinin ise NIR ışığına göre inhibisyon etkisinin %8 oranı ile daha az olduğu belirlenmiştir. BP

maddesi NIR ışığı ile birlikte muamele edildiğinde ise inhibisyon oranının %28 olduğu görülmüştür. BP/Ag maddesinin biyofilm inhibisyon etkisinin NIR yokluğunda ve NIR varlığında sırasıyla %33.5 ve %35 olduğu; BP/Au maddesinin inhibisyon oranlarının %33.3 ve %57.6 olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$). Bu durumda BP/Au maddesinin *E. faecalis* suşu üzerindeki antibiyofilm etkisinin diğer maddelere kıyasla en yüksek olduğu belirlenirken, BP maddesinin en düşük olduğu belirlenmiştir.

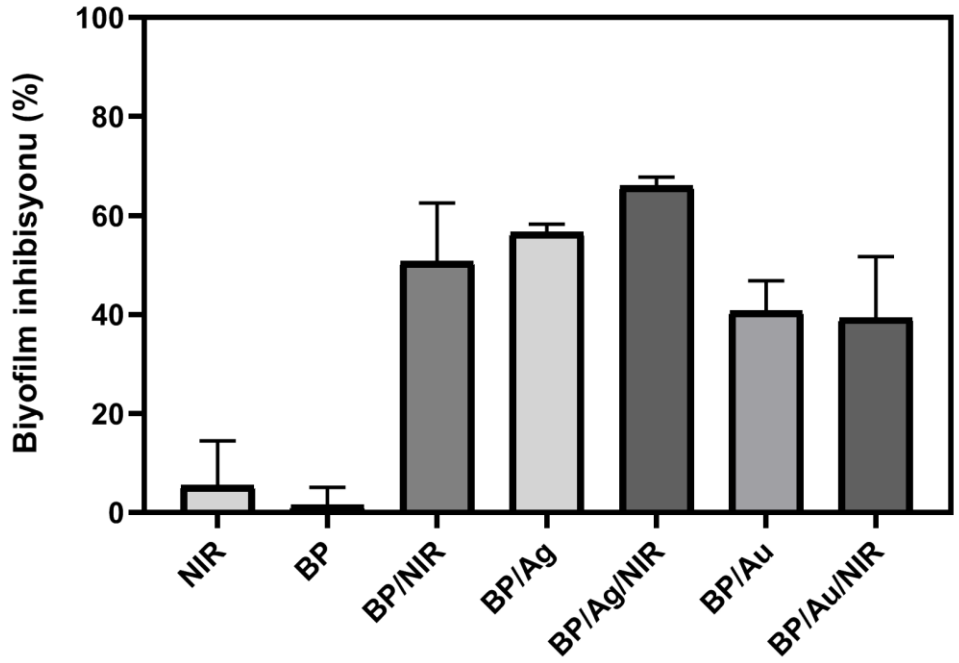


Şekil 4.43. BP, BP/Ag ve BP/Au malzemelerinin NIR ışığı varlığında ve yokluğunda *E. faecalis* suşunun biyofilm inhibisyonu üzerindeki etkisi (%). Her değer üç tekrar ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

4.3.1. BP, BP-Au ve BP-Ag Nanomalzemelerinin *Staphylococcus aureus* Bakterisinin Oluşturduğu Biyofilm Üzerindeki İnhibisyon Etkisi

Şekil 4.44 malzemelerin (64 µg/ml) ışıklı/ışıksız ortamdaki biyofilm inhibisyon oranlarını gösteren bir bar grafiğidir. Yalnızca NIR ışığının %5.5 oranında *S. aureus* biyofilmini inhibe ettiği gözlenmiştir. BP maddesinin ise NIR ışığına göre inhibisyon etkisinin %1.5 oranı ile daha az olduğu belirlenmiştir. BP maddesi NIR ışığı ile birlikte muamele edildiğinde ise *S. aureus* biyofilmini %50.6 oranında inhibe ettiği görülmüştür. BP/Au maddesinin biyofilm inhibisyon etkisinin NIR yokluğunda ve NIR varlığında sırasıyla %40.7 ve %39.3 olduğu; BP/Ag maddesinin inhibisyon oranlarının %56.5 ve %65.9 olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$). Bu durumda BP/Ag maddesinin *S.*

aureus suşu üzerindeki antibiyofilm etkisinin diğer maddelere kıyasla en yüksek olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.44. BP, BP/Ag ve BP/Au malzemelerinin NIR ışığı varlığında ve yokluğunda *S. aureus* suşunun biyofilm inhibisyonu üzerindeki etkisi (%). Her değer üç tekrar ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Bu çalışmada BP nanotabakaları, BP/Ag ve BP/Au nanohibrit malzemelerin 808 nm dalga boylu lazer ışığı etkisindeki fototermal aktiviteye bağlı *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* ve MRSA bakterileri üzerinde gösterdiği antibakteriyel ve antibiyofilm aktiviteleri araştırılmıştır.

Öncelikle antibakteriyel/antibiyofilm aktivite çalışmalarında kullanılmak için siyah fosfor nanotabakaları kimyasal buhar taşıma yöntemiyle sentezlenmiştir. Daha sonra sentezlenen Au ve Ag nanoparçacıkları siyah fosfor nanotabakalarının üzerine dekore edilerek BP/Ag ve BP/Ag hibrit yapıları oluşturulmuştur. Bu nanomalzemelerin yapıları X-ışınları kırınımı (XRD) analizi, geçirimli elektron mikroskopisi (TEM), Raman spektroskopisi ve zamana bağlı emisyon spektroskopisi (TRES) gibi metotlarla karakterize edilmiştir. Toz halde sentezlenen bu malzemeler oksijensiz bir ortamda saf suda dispers edilip NIR ışığındaki (808 nm 1 W/cm^2) fototermal etkileri incelenmiştir. En yüksek fototermal dönüşüm verimliliği BP/Au nanohibridinde gözlenmiştir. Daha sonra bu malzemelerin her bir bakteri üzerindeki antibakteriyel etkinliği ilk olarak 24 saatlik bakteri optik yoğunlukları ölçülerek incelenmiştir. Buna göre BP maddesi en etkili antibakteriyel performansı *E. coli* üzerinde göstermiştir. *E. coli* suşunun büyüme eğrisine bakıldığında kontrol grubu ve NIR grubu inkübasyonun ilk 2 saatinde lag fazındadır ve 2. Saatten sonra log fazına geçer. Ancak BP ile muamele edilen *E. coli*'nin üremesi sonraki 2 saat boyunca da baskılanmıştır. Bu süreden sonra bakteriyostatik etkisini kaybetmiştir ve üreme aynı şekilde devam etmiştir. Ancak BP ile birlikte NIR ışımasına maruz bırakılan örneklerdeki üremenin kontrol grubuna göre oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. BP ile muamele edilen *E. faecalis*, *S. aureus* ve MRSA bakterilerin üremeleri ise lag fazından sonraki 1-2 saat baskılanmasına rağmen bu süreden sonra bakterilerin hızlı bir şekilde üremeye devam ettiği gözlenmiştir. BP/Ag maddesi en etkili antibakteriyel etkiyi *E. faecalis* üzerinde göstermiştir. *E. feacalis* suşunun büyüme eğrisine bakıldığında lag fazı çok kısa sürmüştür. Kontrol grubu ve NIR grubu inkübasyonun ilk 1 saatinde lag fazındadır ve 1. saatten sonra log fazına geçer. Ancak BP/Ag ile muamele edilen *E. faecalis*'in üremesi lag fazından sonraki 4 saat boyunca baskılanmıştır. Bu süreden sonra bakteriyostatik etkisini kaybetmiştir; ancak kontrol grubuna göre bakteri yoğunluğunda yaklaşık %50 oranında azalma

gözlenmiştir. BP/Ag ile muamele edilen *E. coli, S. aureus* ve MRSA bakterilerinin üremeleri ise lag fazından sonraki 1-2 saat baskılanmasına rağmen bu süreden sonra bakterilerin hızlı bir şekilde üremeye devam ettiği gözlenmiştir. BP/Au ise en güçlü antibakteriyel etkiyi BP/Ag gibi *E. faecalis* üzerinde göstermiştir. BP/Au maddesi tek başına *E. faecalis* üremesini lag fazından sonraki ilk 5 saat inhibe etmiştir. Ancak 5 saat sonra bakteriyostatik etkisini kaybetmiştir. BP/Au maddesi ve NIR ile ışınlanan bakteri örneğinde ise 24 saat boyunca bakteri üremesi baskılanmıştır. Malzemelerin bakteri üremesini ilk başta baskılayıp daha sonra bu etkiyi kaybetmesine nanomalzemelerin aktif yüzey alanının fiziksel etkisinin dışında kalan az sayıda bakterilerin neden olabileceği düşünülmektedir (Wu ve ark., 2018).

Koloni sayımı sonuçlarına bakıldığında ise BP maddesi *E. coli, E. faecalis* ve *S. aureus* suşları ile tek başına muamele edildiğinde bakteri sağ kalım oranlarının sırasıyla %44, %40 ve %45 olduğu bulunmuştur. BP maddesi NIR ışımasına maruz bırakıldığında ise bakteri sağ kalım oranları sırasıyla %26, %27 ve %22'ye düşmüştür. Ancak BP maddesinin MRSA bakterileri üzerinde hiç etkisinin olmadığı gözlenmiştir. BP/Ag nanohibrit yapısı *E. coli, E. faecalis, S. aureus* ve MRSA suşları ile tek başına muamele edildiğinde bakteri sağ kalım oranlarının sırasıyla %27, %0, %55 ve %91.3 olduğu bulunmuştur. BP/Ag nanohibridinin NIR ışık varlığından bağımsız olarak *E. faecalis* bakterilerinin tamamını öldürebilme potansiyeline sahip olduğu görülmüştür. BP/Ag nanohibridi NIR ışımasına maruz bırakıldığında ise *E. coli, S. aureus* ve MRSA bakteri sağ kalım oranları sırasıyla %10, %52 ve %58'e düşmüştür. BP/Au nanohibrit yapısı *E. coli, E. faecalis* ve *S. aureus* suşları ile tek başına muamele edildiğinde bakteri sağ kalım oranlarının sırasıyla %17, %5 ve %47 olduğu bulunmuştur. BP/Au nanohibridi NIR ışımasına maruz bırakıldığında ise bakteri sağ kalım oranları sırasıyla %6, %0 ve %31'e düşmüştür. BP/Au'nun MRSA üzerindeki ise kayda değer bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Daha önce yapılan çalışmalardaki siyah fosfor nanotabakaları ve siyah fosfor/Altın ve Gümüş NP kompozitlerinin çeşitli bakteriler üzerindeki antibakteriyel etkileri ve etki mekanizmaları ile bu tez çalışmasındaki sonuçların karşılaştırıldığı tablo Çizelge 5.1'de gösterilmiştir.

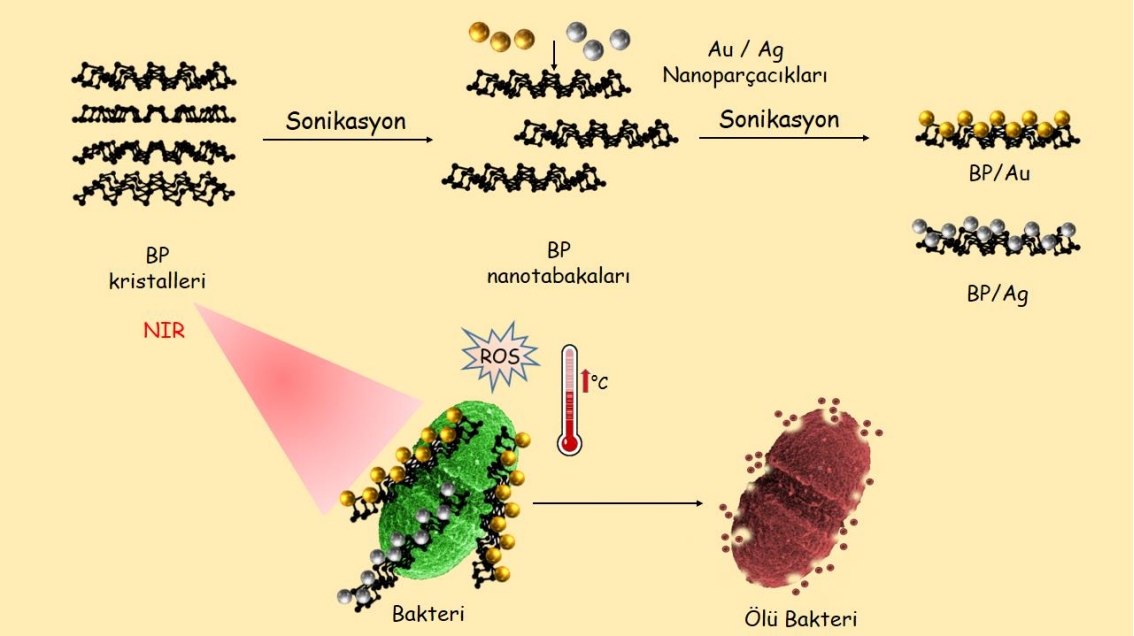
Çizelge 5.1. Literatürdeki siyah fosfor nanotabakaları (NT) ve siyah fosfor/altın ve gümüş nanokompozitlerinin çeşitli bakteriler üzerindeki antibakteriyel etkileri

Nanomalzeme	Miktar (μg/ml)	Bakteri	Antibakteriyel aktivite (%)	Antibakteriyel Mekanizma	Kaynak
Siyah Fosfor NT	100	*E. coli* ve *B. subtilis*	%98 ve %91	Oksidatif stres ve membran hasarı	(Xiong ve ark., 2018a)
Siyah Fosfor NT	10-5000	*E. coli* ve *S. aureus*	Belirtilmemiş	Serbest oksijen türleri oluşumu	(Liu ve ark., 2020)
Siyah Fosfor NT	1280	*E. coli* ve *S. aureus*	%99	Membran hasarı	(Sun ve ark., 2018a)
Siyah Fosfor-$TiSA_4$ Kompleksi	50	*E. coli* ve *S. aureus*	%99 ve %95	Membran hasarı, protein sentezi inaktivasyonu ve DNA hasarı	(Li ve ark., 2019a)
Siyah Fosfor NT-PPMS-EPO	Belirtilmemiş	*E. coli* ve *S. aureus*	%99	Serbest oksijen türleri oluşumu, fototermal etki	(Tan ve ark., 2018a)
Siyah Fosfor NT	100	*E. coli*	~%95	Membran hasarı, hücresel bütünlüğün kaybı, DNA yapısının bozulması	(Phakatkar ve ark., 2020a)
Siyah Fosfor-Altın NP	6.3	*E. coli*	%94.7	Belirtilmemiş	(Wu ve ark., 2018)
Siyah Fosfor-Gümüş NP	50	MRSA	99%	Oksidatif stres, fototermal etki, gümüş iyonu salınımı	(Ouyang ve ark., 2018a)
Siyah Fosfor NT	128	*E. coli, E. faecalis, S. aureus*	%56, %60 ve %55 (ışık yokluğunda)	Fototermal etki, oksidatif stres, membran hasarı	Bu çalışma
			%74, %73 ve %78 (ışık varlığında)		
Siyah Fosfor-Gümüş NP	128	*E. coli, E. faecalis, S. aureus,* MRSA	%83, %100 , %45 ve %8.7 (ışık yokluğunda)	Fototermal etki, oksidatif stres, membran hasarı	Bu çalışma
			%90, %100, %48 ve %42 (ışık varlığında)		
Siyah Fosfor-Altın NP	128	*E. coli, E. faecalis, S. aureus*	%83, %95 ve %53 (ışık yokluğunda)	Fototermal etki, oksidatif stres, membran hasarı	Bu çalışma
			%94, %100 ve %69		

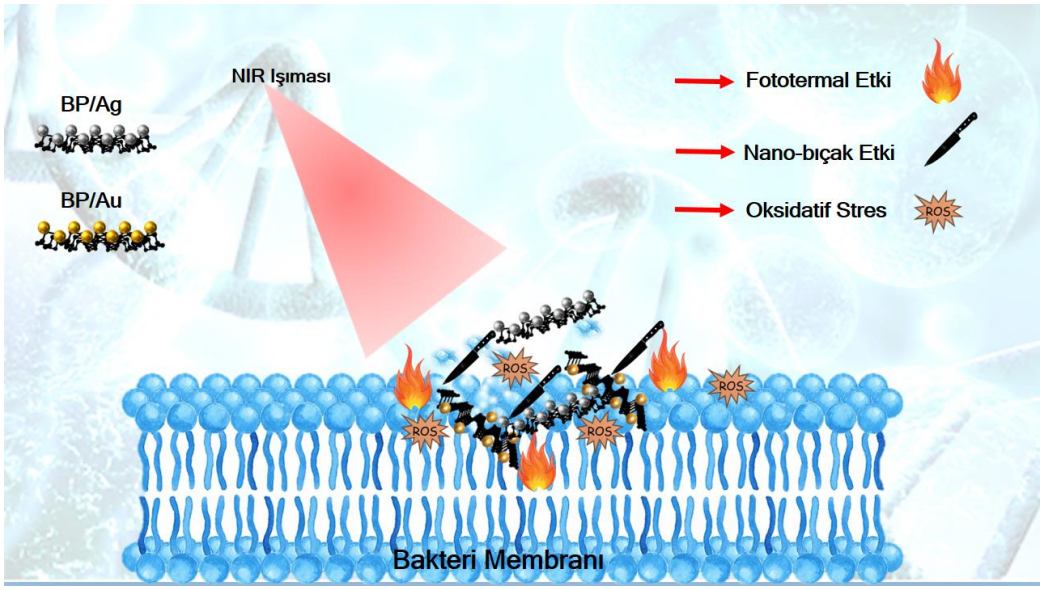
			(ışık varlığında)		

Buradan malzemelerin antibakteriyel performanslarının NIR ışımasıyla birlikte arttığı sonucu çıkarılmaktadır. Bunun sebeplerinden birinin fototermal etki olduğu düşünülmektedir. Şekil 4.6 ve 4.7'de görüldüğü üzere sentezlenen nanomalzemeler NIR ışımasıyla ortam sıcaklığını arttırmaktadır. Bu sıcaklık hücre membranına ve hücresel bileşenlere zarar verebilir. Bir diğer sebep ise Şekil 4.42'de görüldüğü üzere nanomalzemelerin oluşturduğu oksidatif stresin NIR ışımasıyla birlikte artmasıdır. Oksidatif stres analizi GSH kayıp oranları bulunarak belirlenmiştir. NIR ışık yokken BP nanotabakaları %23.1 oranıyla en düşük; BP/Ag nanohibridi %42 oranıyla en yüksek GSH kaybına sebep olmuştur. BP/Ag nanohibridinin BP/Au'ya oranla daha çok ROS oluşturması BP/Ag'nin Ag^+ iyonları salınımı yapmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Ouyang ve ark., 2018a). Bakterilerde ROS oluşumu lipid peroksidasyonu, DNA/RNA kırılımı, hücre sinyallerine müdahale etme, ATP inhibisyonu ve protein oksidasyonu gibi hayati öneme sahip fonksiyon bozukluklarına sebep olabilmektedir (von Moos ve Slaveykova, 2014). Floresan ve SEM görüntülerine göre ise NIR ışıması katkısıyla gerçekleşen üstün antibakteriyel aktivitede malzemelerin ışık etkisiyle membran hasarını daha da arttırmasının da etkili olduğu sonucu çıkarılmaktadır. Bu sonucun özellikle 2 boyutlu nanomalzemelerin membran zarını delip geçmesi olarak bilinen nanobıçak etkiden kaynaklandığı düşünülmektedir (Ouyang ve ark., 2018a). Siyah fosfor keskin kenarları sayesinde bakteri membranıyla fiziksel bir temas kurarak onu tahrip eder (Xiong ve ark., 2018a). Ayrıca altın ve gümüş NP'lar bakteri membranına adsorbe olarak zar bütünlüğünü bozabilmektedir (Li ve ark., 2010; Li ve ark., 2014b). Literatürde siyah fosforun çeşitli *E. coli, S. aureus, B. subtilis* bakterileri üzerinde antibakteriyel etkisinin olduğu belirtilmiştir (Sun ve ark., 2018b; Tan ve ark., 2018a; Xiong ve ark., 2018a; Li ve ark., 2019a; Liu ve ark., 2019). Bu çalışmaların tümünde BP nanotabakalarının tek başına bakterilerin tamamını yok edemediği gözlenmiştir. Ancak destekleyici bazı çözücülerin eklenmesiyle bakterilerin belirli bir kısmı öldürülebilmiştir. Bu çalışmada ise BP nanotabakaları herhangi bir kimyasal çözücü eklenmeden sadece suda dağıtılarak kullanılmıştır. Ayrıca bu tez çalışmasında literatürde daha önce BP'nin antibakteriyel etkisinin üzerinde denenmediği önemli patojenlerden *E. faecalis* ve MRSA suşları kullanılmıştır. Bunların yanı sıra, bu çalışmada BP nanotabakalarına önemli birer antibakteriyel ajan olan Ag ve Au nanoparçacıkları konjuge edilerek BP/Ag ve BP/Au nanohibrit yapıları

oluşturulmuştur. Literatürde farklı yöntemlerle sentezlenen BP/Ag ve BP/Au ile ilgili yapılan yalnızca iki çalışma vardır. Bu çalışmada ise bu maddelerin NIR ışık varlığında/yokluğunda 4 farklı bakteri türü üzerindeki antibakteriyel etkileri çalışılmıştır. BP/Ag ve BP/Au nanomalzemeleri önemli bir patojen olan *E. faecalis* bakterilerinin tamamını öldürmüştür. Malzemelerin sentezi ve antibakteriyel etki mekanizması Şekil 5.1 ve Şekil 5.2'de grafiksel olarak gösterilmiştir.



Şekil 5.1. BP, BP/Ag ve BP/Au malzemelerinin sentezinin ve NIR ışığı etkisindeki antibakteriyel aktivitesinin grafiksel gösterimi



Şekil 5.2. BP/Ag ve BP/Au malzemelerinin NIR ışığı etkisinde bakteri membranında gerçekleştirdiği antibakteriyel mekanizmanın grafiksel gösterimi

Bunların dışında, güçlü ve non-toksik bir antibakteriyel ajan olan siyah fosforun ciddi sağlık problemlerine yol açan biyofilm tabakalarının giderilmesine dair şimdiye kadar yapılan hiçbir çalışma yoktur. Bu tez çalışmasında literatürün bu eksikliğini gidermek amacıyla BP, BP/Ag ve BP/Au nanomalzemelerinin *E. faecalis* ve *S. aureus* BP nanotabakalarının NIR ışıması altında *E. faecalis, S. aureus* ve MRSA biyofilmlerini sırasıyla %28 ve %50.6 oranında; BP/Au nanohibridinin NIR ışıması altında %57.6 ve %39.3; BP/Ag nanohibridinin ise NIR ışıması altında %35 ve %65.9 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir. Şimdiye kadar bildirilen 2 boyutlu benzer malzemelerle BP nanotabakalarının ve BP/Ag, BP/Au nanohibritlerinin antibiyofilm performansını karşılaştırmak için Çizelge 5.2 hazırlanmıştır.

Çizelge 5.2. 2 boyutlu nanomalzemelerin antibiyofilm aktivitesi üzerine yapılmış önceki çalışmalar

Malzeme	Konsantrasyon (µg/ml)	Bakteri	Biyofilm inhibisyonu (%)	Kaynak
GO nanotabakaları	100	*E. coli and P. aeruginosa*	~ %50	(Ramalingam ve ark., 2019b)
Graphene nanoplateletleri	-	*S. mutans*	%56	(Bregnocchi ve ark., 2017)
GO, GO-Tob ve GO-Tob@CuS	100	*S. aureus* and *P. aeruginosa*	%20, %50 and % 80	(Dai ve ark., 2018)
g-C_3N_4	-	*S. epidermidis*	-	(Shen ve ark., 2018)
Ag/g-C_3N_4	200	*S. aureus*	70%	(Bing ve ark., 2015)
MoS_2 nanotabakaları	30	MRSA	~70%	(Pandit ve ark., 2016)
TiO_2 ve Ag-TiO_2 kompoziti	-	*E. coli* and *S. aureus*	56% and 77% for *E. coli* 43% and 67% for S. aureus	(Natarajan, 2015a)
NanoZnO/Ze	10.000	*E. faecalis*	85.2%	(Partoazar ve ark., 2019)
Au nanoparçacıkları	20	*C. albicans*	< 1%	(Khan ve ark., 2012)
BP	64	*E. faecalis S. aureus*	%28 ve %50.6	Bu çalışma
BP/Au	64	*E. faecalis* ve *S. aureus*	%57.6 ve %39.3	Bu çalışma
BP/Ag	64	*E. faecalis* ve *S. aureus*	%35 ve %65.9	Bu çalışma

5.2 Öneriler

Bu tez çalışmasında canlı hücrelerle biyouyumluluk gösteren siyah fosforun keskin kenarlara sahip 2 boyutlu yapısı sayesinde bakteri hücrelerinin membranlarının tahribatına yol açması, aynı zamanda Ag/Au NP'ları ile birleştirilmiş nanohibrit yapılarının NIR ışıması altında göstermiş olduğu fototermal etki, yarattığı oksidatif stres ve bunlara bağlı membran tahribatı mekanizmaları aracılığıyla patojen bakteriler üzerindeki antibakteriyel/antibiyofilm aktiviteleri incelenmiştir. Bu çalışma ile patojen bakterilerin sebebiyet verdiği enfeksiyon hastalıklarının tedavisi için yeni bir bakış açısı oluşturularak bakteriyel enfeksiyonla mücadelede yeni platformların daha da geliştirileceği öngörülmektedir.

Gelecekteki çalışmalarda siyah fosfor nanotabakaları farklı yüzeylere kaplanarak bu yüzeylerin bakteri tutma kapasiteleri belirlenebileceği gibi, farklı malzeme ve ilaçlarla oluşturulan siyah fosfor tabanlı nanohibrit yapıların NIR ışık altında bakteri ve biyofilmler üzerine etkileri daha detaylı araştırılabilir. Bu çalışmada yapılan deneylerde sentezlenen malzemelerin antibakteriyel etki mekanizmasının fototermal etki, ROS oluşumu ve membran hasarı olabileceği gösterilmiştir. İlerleyen çalışmalarda malzemelerin bakteri hücreleri üzerindeki etki mekanizması mikrodizi veri analizleri, proteomik analizler ve lipit peroksidasyon ölçüm teknikleri ile DNA, protein ve lipit yapılarına bakılarak daha da aydınlatılabilir.

KAYNAKLAR

Akhavan, O. ve Ghaderi, E. J. A. n., 2010, Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria, 4 (10), 5731-5736.

Asahina, H., Shindo, K. ve Morita, A., 1982, Electronic-Structure of Black Phosphorus in Self-Consistent Pseudopotential Approach, *Journal of the Physical Society of Japan*, 51 (4), 1193-1199.

Asahina, H. ve Morita, A., 1984, Band-Structure and Optical-Properties of Black Phosphorus, *Journal of Physics C-Solid State Physics*, 17 (11), 1839-1852.

ASTM, E. J. A. i., 2006, 2456-06 Terminology for Nanotechnology, 2.

Austin, L. A., Mackey, M. A., Dreaden, E. C. ve El-Sayed, M. A., 2014, The optical, photothermal, and facile surface chemical properties of gold and silver nanoparticles in biodiagnostics, therapy, and drug delivery, *Arch Toxicol*, 88 (7), 1391-1417.

Bakkiyaraj, D. ve Pandian, S., 2014, Biofilm inhibition by nanoparticles, In: Antibiofilm Agents, Eds: Springer, p. 385-406.

Balkan, T., Küçükkeçeci, H., Zarenezhad, H., Kaya, S. ve Metin, Ö., 2020, One-pot synthesis of monodisperse copper–silver alloy nanoparticles and their composition-dependent electrocatalytic activity for oxygen reduction reaction, *Journal of Alloys Compounds*
154787.

Baykara, T., Günay, V. ve Musluoğlu, E. J. T. M., 2010, Nanoteknoloji ve nano-malzeme süreçleri.

Beyth, N., Houri-Haddad, Y., Domb, A., Khan, W. ve Hazan, R., 2015, Alternative antimicrobial approach: nano-antimicrobial materials, *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 246012.

Bhattacharya, R. ve Mukherjee, P. J. A. d. d. r., 2008, Biological properties of "naked" metal nanoparticles, 60 (11), 1289-1306.

Bing, W., Chen, Z., Sun, H., Shi, P., Gao, N., Ren, J. ve Qu, X., 2015, Visible-Light-Driven Enhanced Antibacterial and Biofilm Elimination Activity of Graphitic Carbon Nitride by Embedded Ag Nanoparticles, *Nano Research*
8(5), 1648-1658.

Biswas, S. K. ve Rahman, I., 2009, Environmental Toxicity, Redox Signaling and Lung Inflammation: The Role of Glutathione, *Molecular Aspects of Medicine*
30 (1-2), 60-76.

Boca, S. C., Potara, M., Gabudean, A.-M., Juhem, A., Baldeck, P. L. ve Astilean, S., 2011, Chitosan-Coated Triangular Silver Nanoparticles as a Novel Class of Biocompatible, Highly Effective Photothermal Transducers for In Vitro Cancer Cell Therapy, *Cancer Letters*, 311 (2), 131-140.

Bregnocchi, A., Zanni, E., Uccelletti, D., Marra, F., Cavallini, D., De Angelis, F., De Bellis, G., Bossù, M., Ierardo, G. ve Polimeni, A., 2017, Graphene-Based Dental Adhesive with Anti-biofilm Activity, *Journal of Nanobiotechnology*, 15 (1), 89.

Bridgman, P., 1914, TWO NEW MODIFICATIONS OF PHOSPHORUS, *Journal of the American Chemical Society*, 36 (7), 1344-1363.

Buzea, C., Pacheco, II ve Robbie, K., 2007, Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity, *Biointerphases*, 2 (4), MR17-71.

Carniol, K. ve Gilmore, M. S., 2004, Signal transduction, quorum-sensing, and extracellular protease activity in Enterococcus faecalis biofilm formation, *Journal of bacteriology*, 186 (24), 8161-8163.

Castellanos-Gomez, A., Vicarelli, L., Prada, E., Island, J. O., Narasimha-Acharya, K. L., Blanter, S. I., Groenendijk, D. J., Buscema, M., Steele, G. A., Alvarez, J. V., Zandbergen, H. W., Palacios, J. J. ve van der Zant, H. S. J., 2014, Isolation and characterization of few-layer black phosphorus, *2D Materials*, 1 (2), 025001.

Chai, Y.-C., Ashraf, S. S., Rokutan, K., Johnston, R. B. ve Thomas, J. A., 1994, S-Thiolation of Individual Human Neutrophil Proteins Including Actin by Stimulation of The Respiratory Burst: Evidence Against a Role for Glutathione Disulfide, *Archives of Biochemistry Biophysics*
310 (1), 273-281.

Chen, W., Ouyang, J., Liu, H., Chen, M., Zeng, K., Sheng, J., Liu, Z., Han, Y., Wang, L. ve Li, J., 2017a, Black Phosphorus Nanosheet-Based Drug Delivery System for Synergistic Photodynamic/Photothermal/Chemotherapy of Cancer, *Advanced Materials*
29 (5), 1603864.

Chen, Y., Ren, R., Pu, H., Chang, J., Mao, S. ve Chen, J., 2017c, Field-effect transistor biosensors with two-dimensional black phosphorus nanosheets, *Biosensors and Bioelectronics*, 89 (Pt 1), 505-510.

Choi, J. R., Yong, K. W., Choi, J. Y., Nilghaz, A., Lin, Y., Xu, J. ve Lu, X., 2018a, Black Phosphorus and its Biomedical Applications, *Theranostics*, 8 (4), 1005-1026.

Cortés, M. E., Bonilla, J. C. ve Sinisterra, R. D., 2011b, Biofilm formation, control and novel strategies for eradication, *Sci Against Microbial Pathog Commun Curr Res Technol Adv*, 2, 896-905.

Costerton, J. W., Stewart, P. S. ve Greenberg, E. P., 1999, Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, *Science*, 284 (5418), 1318-1322.

Dai, X., Zhao, Y., Yu, Y., Chen, X., Wei, X., Zhang, X. ve Li, C., 2018, All-in-one NIR-Activated Nanoplatforms for Enhanced Bacterial Biofilm Eradication, *Nanoscale*, 10 (39), 18520-18530.

Dakal, T. C., Kumar, A., Majumdar, R. S. ve Yadav, V. J. F. i. m., 2016, Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles, 7, 1831.

Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W. ve Greenberg, E. P., 1998, The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm, *Science*, 280 (5361), 295-298.

De Beer, D., Stoodley, P., Roe, F. ve Lewandowski, Z., 1994, Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport, *Biotechnology Bioengineering*
43 (11), 1131-1138.

Deng, Y., Luo, Z., Conrad, N. J., Liu, H., Gong, Y., Najmaei, S., Ajayan, P. M., Lou, J., Xu, X. ve Ye, P. D. J. A. n., 2014, Black phosphorus–monolayer MoS2 van der Waals heterojunction p–n diode, 8 (8), 8292-8299.

Du, H. W., Lin, X., Xu, Z. M. ve Chu, D. W., 2015, Recent developments in black phosphorus transistors, *Journal of Materials Chemistry C*, 3 (34), 8760-8775.

Durán, N., Durán, M., De Jesus, M. B., Seabra, A. B., Fávaro, W. J. ve Nakazato, G., 2016, Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology Medicine*
12 (3), 789-799.

Enright, M. C., Robinson, D. A., Randle, G., Feil, E. J., Grundmann, H. ve Spratt, B. G., 2002, The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA), *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (11), 7687-7692.

Erbay, A. Y. ve İdil, A. T. D., 2009, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde hastaneden edinilmiş Acinetobacter baumannii bakteriyemilerinde fatalite hızı ve ilgili risk etmenleri, *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Halk Sağlığı Anabilim Dalı*.

Eustis, S. ve El-Sayed, M. A., 2006, Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes, *Chemical Society Reviews*, 35 (3), 209-217.

Fahey, R., Brown, W., Adams, W. ve Worsham, M., 1978, Occurrence of glutathione in bacteria, *Journal of bacteriology*, 133 (3), 1126-1129.

Fahey, R. C. ve Sundquist, A. R., 1991, Evolution of glutathione metabolism, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol*, 64 (1), 53.

Fitzgerald, J. R., Sturdevant, D. E., Mackie, S. M., Gill, S. R. ve Musser, J. M., 2001, Evolutionary genomics of Staphylococcus aureus: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (15), 8821-8826.

Fu, H., Li, Z., Xie, H., Sun, Z., Wang, B., Huang, H., Han, G., Wang, H., Chu, P. K. ve Yu, X.-F., 2017, Different-Sized Black Phosphorus Nanosheets with Good Cytocompatibility and High Photothermal Performance, *RSC Advances*
7(24), 14618-14624.

Goh, H. S., Yong, M. A., Chong, K. K. L. ve Kline, K. A., 2017, Model systems for the study of Enterococcal colonization and infection, *Virulence*, 8 (8), 1525-1562.

Gole, A. ve Murphy, C. J., 2004, Seed-mediated synthesis of gold nanorods: Role of the size and nature of the seed, *Chemistry of Materials*, 16 (19), 3633-3640.

Guiton, P. S., Hung, C. S., Hancock, L. E., Caparon, M. G. ve Hultgren, S. J., 2010a, Enterococcal biofilm formation and virulence in an optimized murine model of foreign body-associated urinary tract infections, *Infect Immun*, 78 (10), 4166-4175.

Guo, H., Lu, N., Dai, J., Wu, X. ve Zeng, X. C. J. T. J. o. P. C. C., 2014, Phosphorene nanoribbons, phosphorus nanotubes, and van der Waals multilayers, 118 (25), 14051-14059.

Gupta, A., Landis, R. F. ve Rotello, V. M. J. F., 2016a, Nanoparticle-based antimicrobials: surface functionality is critical, 5.

Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S. ve Tribedi, P., 2016b, Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review, *Archives of Microbiology*, 198 (1), 1-15.

Gün, İ. ve Ekinci, F. Y., 2009, Biyofilmler: yüzeylerdeki mikrobiyal yaşam, *Gıda*, 34 (3), 165-173.

Hamblin, M. R. ve Avci, P., 2015, Applications of Nanoscience in Photomedicine, Elsevier, p.

Harding, S. E., 1986, Applications of Light Scattering in Microbiology, *Biotechnology Applied Biochemistry*
8(6), 489-509.

He, Y., del Valle, A., Qian, Y. ve Huang, Y.-F., 2017, Near infrared light-mediated enhancement of reactive oxygen species generation through electron transfer from graphene oxide to iron hydroxide/oxide, *Nanoscale*, 9 (4), 1559-1566.

Hemeg, H. A., 2017, Nanomaterials for alternative antibacterial therapy, *Int J Nanomedicine*, 12, 8211-8225.

Hiramatsu, K., 1995, Molecular evolution of MRSA, *Microbiology immunology*
39 (8), 531-543.

Huang, W.-C., Tsai, P.-J. ve Chen, Y.-C., 2007a, Functional Gold Nanoparticles as Photothermal Agents for Selective-Killing of Pathogenic Bacteria, *Future Medicine*.

Huang, W. C., Tsai, P. J. ve Chen, Y. C. J. S., 2009, Multifunctional Fe3O4@ Au nanoeggs as photothermal agents for selective killing of nosocomial and antibiotic-resistant bacteria, 5 (1), 51-56.

Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H. ve El-Sayed, M. A., 2007b, Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy, *Nanomedicine (Lond)*, 2 (5), 681-693.

Hyland, R. M., Beck, P., Mulvey, G. L., Kitov, P. I. ve Armstrong, G. D., 2006, N-acetyllactosamine conjugated to gold nanoparticles inhibits enteropathogenic Escherichia coli colonization of the epithelium in human intestinal biopsy specimens, *Infect Immun*, 74 (9), 5419-5421.

Jabra-Rizk, M., Meiller, T., James, C. ve Shirtliff, M., 2006, Effect of farnesol on Staphylococcus aureus biofilm formation and antimicrobial susceptibility, *Antimicrobial agents chemotherapy*
50 (4), 1463-1469.

Jalvo, B., Faraldos, M., Bahamonde, A. ve Rosal, R., 2017, Antimicrobial and antibiofilm efficacy of self-cleaning surfaces functionalized by TiO2 photocatalytic nanoparticles against Staphylococcus aureus and Pseudomonas putida, *Journal of hazardous materials*
340, 160-170.

Jang, J., Choi, Y., Tanaka, M. ve Choi, J., 2020, Development of silver/graphene oxide nanocomposites for antibacterial and antibiofilm applications, *Journal of Industrial Engineering Chemistry*
83, 46-52.

Jansen, K. U., Knirsch, C. ve Anderson, A. S., 2018, The role of vaccines in preventing bacterial antimicrobial resistance, *Nat Med*, 24 (1), 10-19.

Jaque, D., Martinez Maestro, L., del Rosal, B., Haro-Gonzalez, P., Benayas, A., Plaza, J. L., Martin Rodriguez, E. ve Garcia Sole, J., 2014, Nanoparticles for photothermal therapies, *Nanoscale*, 6 (16), 9494-9530.

Jiang, J.-W. ve Park, H. S. J. N. c., 2014, Negative poisson's ratio in single-layer black phosphorus, 5, 4727.

Kadokura, H., 2006, Oxidative Protein Folding: Many Different Ways to Introduce Disulfide Bonds, *Antioxidants Redox Signaling*
8(5-6), 731-733.

Kayiş, U., 2019, Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları, *Aydın Sağlık Dergisi*, 5 (1), 1-12.

Keyik, Ş., 2013, Acinetobacter baumannii suşlarında OXA-23 ve OXA-58 tipi genişlemiş spektrumlu Beta laktamaz varlığının araştırılması ve PFGE yöntemi ile klonal yakınlığının incelenmesi, *Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*.

Khan, S., Alam, F., Azam, A. ve Khan, A. U., 2012, Gold Nanoparticles Enhance Methylene Blue–Induced Photodynamic Therapy: A Novel Therapeutic Approach to Inhibit Candida albicans Biofilm, *International Journal of Nanomedicine*, 7, 3245.

Kim, C.-B., Yi, D. K., Kim, P. S. S., Lee, W. ve Kim, M. J., 2009, Rapid Photothermal Lysis of the Pathogenic Bacteria, Escherichia coli Using Synthesis of Gold Nanorods, *Journal of Nanoscience Nanotechnology*
9(5), 2841-2845.

Kim, J. W., Shashkov, E. V., Galanzha, E. I., Kotagiri, N. ve Zharov, V. P., 2007, Photothermal Antimicrobial Nanotherapy and Nanodiagnostics with Self-Assembling Carbon Nanotube clusters, *Lasers in Surgery Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine Surgery*
39 (7), 622-634.

Kim, T. I., Kwon, B., Yoon, J., Park, I.-J., Bang, G. S., Park, Y., Seo, Y.-S., Choi, S.-Y. ve interfaces, 2017, Antibacterial activities of graphene oxide–molybdenum disulfide nanocomposite films, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9 (9), 7908-7917.

Kırmusaoğlu, S., aureus, A. R. i. S. ve Enany, S., Ed, 2017, MRSA and MSSA: The mechanism of methicillin resistance and the influence of methicillin resistance on biofilm phenotype of Staphylococcus aureus, *The Rise of Virulence*, 25-41.

Koch, A. L., 1970, Turbidity Measurements of Bacterial Cultures in Some Available Commercial Instruments, *Analytical Biochemistry*
38 (1), 252-259.

Krutyakov, Y. A., Kudrinskiy, A. A., Olenin, A. Y. ve Lisichkin, G. V. J. R. C. R., 2008, Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects, 77 (3), 233.

Kumar, V., Brent, J. R., Shorie, M., Kaur, H., Chadha, G., Thomas, A. G., Lewis, E. A., Rooney, A. P., Nguyen, L., Zhong, X. L., Burke, M. G., Haigh, S. J., Walton, A., McNaughter, P. D., Tedstone, A. A., Savjani, N., Muryn, C. A., O'Brien, P., Ganguli, A. K., Lewis, D. J. ve Sabherwal, P., 2016, Nanostructured Aptamer-Functionalized Black Phosphorus Sensing Platform for Label-Free Detection of Myoglobin, a Cardiovascular Disease Biomarker, *ACS Appl Mater Interfaces*, 8 (35), 22860-22868.

Lee, H. U., Park, S. Y., Lee, S. C., Choi, S., Seo, S., Kim, H., Won, J., Choi, K., Kang, K. S., Park, H. G., Kim, H. S., An, H. R., Jeong, K. H., Lee, Y. C. ve Lee, J., 2016, Black Phosphorus (BP) Nanodots for Potential Biomedical Applications, *Small*, 12 (2), 214-219.

Li, L., Yu, Y., Ye, G. J., Ge, Q., Ou, X., Wu, H., Feng, D., Chen, X. H. ve Zhang, Y., 2014a, Black phosphorus field-effect transistors, *Nat Nanotechnol*, 9 (5), 372-377.

Li, W.-R., Xie, X.-B., Shi, Q.-S., Zeng, H.-Y., You-Sheng, O.-Y. ve Chen, Y.-B., 2010, Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on Escherichia coli, *Applied Microbiology Biotechnology*
85 (4), 1115-1122.

Li, X., Robinson, S. M., Gupta, A., Saha, K., Jiang, Z., Moyano, D. F., Sahar, A., Riley, M. A. ve Rotello, V. M., 2014b, Functional Gold Nanoparticles as Potent Antimicrobial Agents Against Multi-Drug-Resistant Bacteria, *ACS Nano*
8(10), 10682-10686.

Li, Y., Yang, S. X. ve Li, J. B., 2014c, Modulation of the Electronic Properties of Ultrathin Black Phosphorus by Strain and Electrical Field, *Journal of Physical Chemistry C*, 118 (41), 23970-23976.

Li, Z., Wu, L., Wang, H., Zhou, W., Liu, H., Cui, H., Li, P., Chu, P. K. ve Yu, X.-F. J. A. A. N. M., 2019b, Synergistic Antibacterial Activity of Black Phosphorus Nanosheets Modified with Titanium Aminobenzenesulfanato Complexes, 2 (3), 1202-1209.

Ling, X., Wang, H., Huang, S., Xia, F. ve Dresselhaus, M. S., 2015, The renaissance of black phosphorus, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112 (15), 4523-4530.

Liu, C., Guo, J., Yan, X., Tang, Y., Mazumder, A., Wu, S. ve Liang, Y., 2017, Antimicrobial nanomaterials against biofilms: an alternative strategy, *Environmental Reviews*, 25 (2), 225-244.

Liu, H., Du, Y., Deng, Y. ve Peide, D. Y., 2015a, Semiconducting black phosphorus: synthesis, transport properties and electronic applications, *Chemical Society Reviews*, 44 (9), 2732-2743.

Liu, W., Zhang, Y., Zhang, Y. ve Dong, A., 2019, Black phosphorus nanosheets counteract bacteria without causing antibiotic resistance, *Chemistry–A European Journal*.

Lu, S. C., 2009, Regulation of Glutathione Synthesis, *Molecular Aspects of Medicine*, 30 (1-2), 42-59.

Luo, Z. C., Liu, M., Guo, Z. N., Jiang, X. F., Luo, A. P., Zhao, C. J., Yu, X. F., Xu, W. C. ve Zhang, H., 2015, Microfiber-based few-layer black phosphorus saturable absorber for ultra-fast fiber laser, *Opt Express*, 23 (15), 20030-20039.

Łysakowska, M. E., Ciebiada-Adamiec, A., Klimek, L. ve Sienkiewicz, M., 2015, The activity of silver nanoparticles (Axonnite) on clinical and environmental strains of Acinetobacter spp, *Burns*, 41 (2), 364-371.

Ma, L., Jackson, K. D., Landry, R. M., Parsek, M. R. ve Wozniak, D. J., 2006, Analysis of Pseudomonas aeruginosa conditional psl variants reveals roles for the psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment, *Journal of bacteriology*, 188 (23), 8213-8221.

Maness, P.-C., Smolinski, S., Blake, D. M., Huang, Z., Wolfrum, E. J. ve Jacoby, W. A., 1999, Bactericidal activity of photocatalytic TiO2 reaction: toward an understanding of its killing mechanism, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (9), 4094-4098.

Marambio-Jones, C. ve Hoek, E. M. V., 2010, A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment, *Journal of Nanoparticle Research*, 12 (5), 1531-1551.

Masip, L., Veeravalli, K. ve Georgiou, G., 2006, The Many Faces of Glutathione in Bacteria, *Antioxidants Redox Signaling*
8(5-6), 753-762.

Mayorga-Martinez, C. C., Mohamad Latiff, N., Eng, A. Y. S., Sofer, Z. ve Pumera, M., 2016, Black Phosphorus Nanoparticle Labels for Immunoassays via Hydrogen Evolution Reaction Mediation, *Anal Chem*, 88 (20), 10074-10079.

McQuillan, J. S., Groenaga Infante, H., Stokes, E. ve Shaw, A. M., 2012, Silver nanoparticle enhanced silver ion stress response in Escherichia coli K12, *Nanotoxicology*, 6 (8), 857-866.

Meister, A., 1988, Glutathione metabolism and its selective modification, *Journal of Biological Chemistry*, 263 (33), 17205-17208.

Miao, H., Teng, Z., Wang, C., Chong, H. ve Wang, G., 2019b, Recent Progress in Two-Dimensional Antimicrobial Nanomaterials, *Chemistry–A European Journal*, 25 (4), 929-944.

Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramirez, J. T. ve Yacaman, M. J., 2005, The bactericidal effect of silver nanoparticles, *Nanotechnology*, 16 (10), 2346-2353.

Naik, K. ve Kowshik, M., 2014, Anti-biofilm efficacy of low temperature processed AgCl–TiO2 nanocomposite coating, *Materials Science Engineering: C*
34, 62-68.

Naskar, A., Khan, H., Sarkar, R., Kumar, S., Halder, D. ve Jana, S., 2018, Anti-biofilm activity and food packaging application of room temperature solution process

based polyethylene glycol capped Ag-ZnO-graphene nanocomposite, *Materials Science Engineering: C*
91, 743-753.
Natarajan, K., 2015a, Antibiofilm Activity of Epoxy/Ag-TiO_2 Polymer Nanocomposite Coatings against Staphylococcus aureus and Escherichia coli, *Coatings*, 5 (2), 95-114.
Neibert, K., Gopishetty, V., Grigoryev, A., Tokarev, I., Al-Hajaj, N., Vorstenbosch, J., Philip, A., Minko, S. ve Maysinger, D., 2012, Wound-healing with mechanically robust and biodegradable hydrogel fibers loaded with silver nanoparticles, *Adv Healthc Mater*, 1 (5), 621-630.
Neu, H. C., 1992, The crisis in antibiotic resistance, *Science*, 257 (5073), 1064-1073.
Norman, R. S., Stone, J. W., Gole, A., Murphy, C. J. ve Sabo-Attwood, T. L., 2008, Targeted Photothermal Lysis of the Pathogenic Bacteria, Pseudomonas aeruginosa, with Gold Nanorods, *Nano Letters*
8(1), 302-306.
Ouyang, J., Liu, R. Y., Chen, W. S., Liu, Z. J., Xu, Q. F., Zeng, K., Deng, L., Shen, L. F. ve Liu, Y. N., 2018b, A black phosphorus based synergistic antibacterial platform against drug resistant bacteria, *Journal of Materials Chemistry B*, 6 (39), 6302-6310.
Ozturk, I., Yurtman, A., Erac, B., Gul-Yurtsever, S., Ermertcan, S. ve Hosgor-Limoncu, M., 2014, In Vitro Effect of Moxifloxacin and Rifampicin on Biofilm Formation by Clinical MRSA Isolates, *Bratislavske Lekarske Listy*, 115 (8), 483.
Pandit, S., Karunakaran, S., Boda, S. K., Basu, B. ve De, M., 2016, High Antibacterial Activity of Functionalized Chemically Exfoliated MoS_2, *ACS Applied Materials & Interfaces*
8(46), 31567-31573.
Park, S.-C., Park, Y. ve Hahm, K.-S., 2011, The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation, *International Journal of Molecular Sciences*, 12 (9), 5971-5992.
Partoazar, A., Talaei, N., Bahador, A., Pourhajibagher, M., Dehpour, S., Sadati, M. ve Bakhtiarian, A., 2019, Antibiofilm Activity of Natural Zeolite Supported NanoZnO: Inhibition of Esp Gene Expression of Enterococcus faecalis, *Nanomedicine*, 14 (6), 675-687.
Pastore, A., Federici, G., Bertini, E. ve Piemonte, F., 2003, Analysis of Glutathione: Implication in Redox and Detoxification, *Clinica Chimica Acta*
333 (1), 19-39.
Pauksch, L., Hartmann, S., Rohnke, M., Szalay, G., Alt, V., Schnettler, R. ve Lips, K. S., 2014, Biocompatibility of silver nanoparticles and silver ions in primary human mesenchymal stem cells and osteoblasts, *Acta Biomater*, 10 (1), 439-449.
Paulsen, I. T., Banerjei, L., Myers, G., Nelson, K., Seshadri, R., Read, T. D., Fouts, D. E., Eisen, J. A., Gill, S. R. ve Heidelberg, J., 2003, Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant Enterococcus faecalis, *Science*, 299 (5615), 2071-2074.
Pelgrift, R. Y. ve Friedman, A. J., 2013, Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65 (13-14), 1803-1815.
Phakatkar, A. H., Firlar, E., Alzate, L., Song, B., Narayanan, S., Rojaee, R., Foroozan, T., Deivanayagam, R., Banner, D. J. ve Shahbazian-Yassar, R., 2020b, TEM Studies on Antibacterial Mechanisms of Black Phosphorous Nanosheets, *International Journal of Nanomedicine*, 15, 3071.

Pozo, D., 2010, Silver nanoparticles, BoD–Books on Demand, Qian, X., Gu, Z. ve Chen, Y., 2017, Two-dimensional black phosphorus nanosheets for theranostic nanomedicine, *Materials Horizons*, 4 (5), 800-816.

Qiao, J., Kong, X., Hu, Z.-X., Yang, F. ve Ji, W., 2014a, Few-layer black phosphorus: emerging direct band gap semiconductor with high carrier mobility, *arXiv preprint arXiv*.

Qiao, J., Kong, X., Hu, Z. X., Yang, F. ve Ji, W., 2014b, High-mobility transport anisotropy and linear dichroism in few-layer black phosphorus, *Nat Commun*, 5, 4475.

Ramalingam, V., Raja, S., Sundaramahalingam, S. ve Rajaram, R., 2019b, Chemical Fabrication of Graphene Oxide Nanosheets Attenuates Biofilm Formation of Human Clinical Pathogens, *Bioorganic chemistry*, 83, 326-335.

Range, H. ve Dose, I., Pathogen Safety Data Sheet: Infectious Substances–Rickettsia akari.

Rasmussen, T. B. ve Givskov, M., 2006, Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs, *International Journal of Medical Microbiology*, 296 (2-3), 149-161.

Rasool, K., Helal, M., Ali, A., Ren, C. E., Gogotsi, Y. ve Mahmoud, K. A., 2016, Antibacterial activity of Ti3C2T x MXene, *ACS nano*, 10 (3), 3674-3684.

Rodin, A. S., Carvalho, A. ve Castro Neto, A. H., 2014, Strain-induced gap modification in black phosphorus, *Phys Rev Lett*, 112 (17), 176801.

Roy, S., Mondal, A., Yadav, V., Sarkar, A., Banerjee, R., Sanpui, P. ve Jaiswal, A., 2019, Mechanistic insight into the antibacterial activity of chitosan exfoliated MoS2 nanosheets: membrane damage, metabolic inactivation, and oxidative stress, *ACS Applied Bio Materials*
2(7), 2738-2755.

Shao, J., Xie, H., Huang, H., Li, Z., Sun, Z., Xu, Y., Xiao, Q., Yu, X.-F., Zhao, Y. ve Zhang, H., 2016, Biodegradable Black Phosphorus-Based Nanospheres for In Vivo Photothermal Cancer Therapy, *Nature Communications*
7(1), 1-13.

Shen, H., López-Guerra, E. A., Zhu, R., Diba, T., Zheng, Q., Solares, S. D., Zara, J. M., Shuai, D. ve Shen, Y., 2018, Visible-Light-Responsive Photocatalyst of Graphitic Carbon Nitride for Pathogenic Biofilm Control, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11 (1), 373-384.

Shigeta, M., Tanaka, G., Komatsuzawa, H., Sugai, M., Suginaka, H. ve Usui, T., 1997, Permeation of antimicrobial agents through Pseudomonas aeruginosa biofilms: a simple method, *Chemotherapy*, 43 (5), 340-345.

Singh, A. K., Mishra, H., Firdaus, Z., Yadav, S., Aditi, P., Nandy, N., Sharma, K., Bose, P., Pandey, A. K. ve Chauhan, B. S., 2019, MoS2-modified curcumin nanostructures: the novel theranostic hybrid having potent antibacterial and antibiofilm activities against multidrug-resistant hypervirulent klebsiella pneumoniae, *Chemical Research in Toxicology*
32 (8), 1599-1618.

Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N. H. M., Ann, L. C., Bakhori, S. K. M., Hasan, H. ve Mohamad, D., 2015, Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism, *Nano-Micro Letters*, 7 (3), 219-242.

Slavin, Y. N., Asnis, J., Häfeli, U. O. ve Bach, H., 2017a, Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity, *Journal of nanobiotechnology*
15 (1), 1-20.

Slavin, Y. N., Asnis, J., Häfeli, U. O. ve Bach, H. J. J. o. n., 2017b, Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity, 15 (1), 65.

Stewart, P. S. ve Costerton, J. W., 2001, Antibiotic resistance of bacteria in biofilms, *The Lancet*, 358 (9276), 135-138.

Stickler, D. J., 2008, Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters, *Nature clinical practice urology*, 5 (11), 598-608.

Stoimenov, P. K., Klinger, R. L., Marchin, G. L. ve Klabunde, K. J., 2002, Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents, *Langmuir*, 18 (17), 6679-6686.

Sun, C., Wen, L., Zeng, J., Wang, Y., Sun, Q., Deng, L., Zhao, C. ve Li, Z., 2016, One-pot solventless preparation of PEGylated black phosphorus nanoparticles for photoacoustic imaging and photothermal therapy of cancer, *Biomaterials*, 91, 81-89.

Sun, Z., Zhao, Y., Li, Z., Cui, H., Zhou, Y., Li, W., Tao, W., Zhang, H., Wang, H. ve Chu, P. K. J. S., 2017, TiL4-Coordinated Black Phosphorus Quantum Dots as an Efficient Contrast Agent for In Vivo Photoacoustic Imaging of Cancer, 13 (11), 1602896.

Sun, Z., Zhang, Y., Yu, H., Yan, C., Liu, Y., Hong, S., Tao, H., Robertson, A. W., Wang, Z. ve Pádua, A. A., 2018a, New Solvent-Stabilized Few-Layer Black Phosphorus for Antibacterial Applications, *Nanoscale*, 10 (26), 12543-12553.

Sun, Z. B., Xie, H. H., Tang, S. Y., Yu, X. F., Guo, Z. N., Shao, J. D., Zhang, H., Huang, H., Wang, H. Y. ve Chu, P. K., 2015, Ultrasmall Black Phosphorus Quantum Dots: Synthesis and Use as Photothermal Agents, *Angewandte Chemie-International Edition*, 54 (39), 11526-11530.

Tack, K. J. ve Sabath, L., 1985, Increased minimum inhibitory concentrations with anaerobiasis for tobramycin, gentamicin, and amikacin, compared to latamoxef, piperacillin, chloramphenicol, and clindamycin, *Chemotherapy*, 31 (3), 204-210.

Takao, Y., Asahina, H. ve Morita, A., 1981, Electronic-Structure of Black Phosphorus in Tight-Binding Approach, *Journal of the Physical Society of Japan*, 50 (10), 3362-3369.

Tan, L., Li, J., Liu, X., Cui, Z., Yang, X., Yeung, K. W. K., Pan, H., Zheng, Y., Wang, X. ve Wu, S., 2018a, In Situ Disinfection through Photoinspired Radical Oxygen Species Storage and Thermal-Triggered Release from Black Phosphorous with Strengthened Chemical Stability, *Small*, 14 (9), 1703197.

Tao, W., Zhu, X. B., Yu, X. H., Zeng, X. W., Xiao, Q. L., Zhang, X. D., Ji, X. Y., Wang, X. S., Shi, J. J., Zhang, H. ve Mei, L., 2017, Black Phosphorus Nanosheets as a Robust Delivery Platform for Cancer Theranostics, *Advanced Materials*, 29 (1), 1603276.

Thallinger, B., Prasetyo, E. N., Nyanhongo, G. S. ve Guebitz, G. M., 2013, Antimicrobial enzymes: an emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms, *Biotechnology Journal*, 8 (1), 97-109.

Tong, S. Y., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L. ve Fowler, V. G., 2015, Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management, *Clinical microbiology reviews*, 28 (3), 603-661.

Tran, V., Soklaski, R., Liang, Y. ve Yang, L., Layer-Controlled Band Gap and Anisotropic Excitons in Phosphorene, *Transport*, 29, 30.

Tüylek, Z. J. N. B. v. T. D., 2016, Küçük Şeylerin Hikayesi: Nanomalzeme, 5 (2), 130-141.

Van Houdt, R. ve Michiels, C. W., 2005, Role of bacterial cell surface structures in Escherichia coli biofilm formation, *Res Microbiol*, 156 (5-6), 626-633.

von Moos, N. ve Slaveykova, V. I., 2014, Oxidative stress induced by inorganic nanoparticles in bacteria and aquatic microalgae–state of the art and knowledge gaps, *Nanotoxicology*, 8 (6), 605-630.

Wang, D., Yi, P., Wang, L., Zhang, L., Li, H., Lu, M., Xie, X., Huang, L. ve Huang, W., 2019b, Revisiting the growth of black phosphorus in Sn-I assisted reactions, *Frontiers in chemistry*, 7, 21.

Wang, H., Yang, X., Shao, W., Chen, S., Xie, J., Zhang, X., Wang, J. ve Xie, Y., 2015, Ultrathin Black Phosphorus Nanosheets for Efficient Singlet Oxygen Generation, *J Am Chem Soc*, 137 (35), 11376-11382.

Wang, L., He, H., Yu, Y., Sun, L., Liu, S., Zhang, C. ve He, L. J. J. o. i. b., 2014, Morphology-dependent bactericidal activities of Ag/CeO2 catalysts against Escherichia coli, 135, 45-53.

Wang, S., Singh, A. K., Senapati, D., Neely, A., Yu, H. ve Ray, P. C., 2010, Rapid Colorimetric Identification and Targeted Photothermal Lysis of Salmonella Bacteria by Using Bioconjugated Oval-Shaped Gold Nanoparticles, *Chemistry–A European Journal*
16 (19), 5600-5606.

Wielders, C., Fluit, A., Brisse, S., Verhoef, J. ve Schmitz, F., 2002, mecA gene is widely disseminated in Staphylococcus aureus population, *Journal of clinical microbiology*, 40 (11), 3970-3975.

Winfield, I., Abarca-Arenas, L. G. ve Chazaro-Olvera, S., 2007, Crustacean macrofoulers in the Veracruz coral reef system, SW Gulf of Mexico: checklist, spatial distribution and diversity, *Cahiers de Biologie Marine*, 48 (3), 287.

Wong, M.-S., Chen, C.-W., Hsieh, C.-C., Hung, S.-C., Sun, D.-S. ve Chang, H.-H., 2015, Antibacterial property of Ag nanoparticle-impregnated N-doped titania films under visible light, *Scientific reports*, 5, 11978.

Wu, Q., Liang, M., Zhang, S., Liu, X. ve Wang, F., 2018, Development of functional black phosphorus nanosheets with remarkable catalytic and antibacterial performance, *Nanoscale*, 10 (22), 10428-10435.

Xiong, Z., Zhang, X., Zhang, S., Lei, L., Ma, W., Li, D., Wang, W., Zhao, Q. ve Xing, B., 2018a, Bacterial Toxicity of Exfoliated Black Phosphorus Nanosheets, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 161, 507-514.

Xu, J.-W., Yao, K. ve Xu, Z.-K., 2019a, Nanomaterials with a Photothermal Effect for Antibacterial Activities: An Overview, *Nanoscale*, 11 (18), 8680-8691.

Xu, J. W., Yao, K. ve Xu, Z. K., 2019b, Nanomaterials with a photothermal effect for antibacterial activities: an overview, *Nanoscale*, 11 (18), 8680-8691.

Xu, Y. H., Wang, Z. T., Guo, Z. N., Huang, H., Xiao, Q. L., Zhang, H. ve Yu, X. F., 2016, Solvothermal Synthesis and Ultrafast Photonics of Black Phosphorus Quantum Dots, *Advanced Optical Materials*, 4 (8), 1223-1229.

Xu, Z. C., Shen, C. M., Xiao, C. W., Yang, T. Z., Zhang, H. R., Li, J. Q., Li, H. L. ve Gao, H. J., 2007, Wet chemical synthesis of gold nanoparticles using silver seeds: a shape control from nanorods to hollow spherical nanoparticles, *Nanotechnology*, 18 (11), 115608.

Yang, D., Yang, G., Yang, P., Lv, R., Gai, S., Li, C., He, F. ve Lin, J., 2017a, Assembly of Au Plasmonic Photothermal Agent and Iron Oxide Nanoparticles on Ultrathin Black Phosphorus for Targeted Photothermal and Photodynamic Cancer Therapy, *Advanced Functional Materials*, 27 (18), 1700371.

Yang, G., Liu, Z., Li, Y., Hou, Y., Fei, X., Su, C., Wang, S., Zhuang, Z. ve Guo, Z. J. B. s., 2017c, Facile synthesis of black phosphorus–Au nanocomposites for

enhanced photothermal cancer therapy and surface-enhanced Raman scattering analysis, 5 (10), 2048-2055.

Yang, X., Li, Z., Ju, E., Ren, J. ve Qu, X., 2014, Reduced Graphene Oxide Functionalized with a Luminescent Rare-Earth Complex for the Tracking and Photothermal Killing of Drug-Resistant Bacteria, *Chemistry–A European Journal*
20 (2), 394-398.

Yin, Q., Tan, L., Lang, Q., Ke, X., Bai, L., Guo, K., Qiao, R. ve Bai, S., 2018, Plasmonic molybdenum oxide nanosheets supported silver nanocubes for enhanced near-infrared antibacterial activity: Synergism of photothermal effect, silver release and photocatalytic reactions, *Applied Catalysis B: Environmental*, 224, 671-680.

Zhang, Y., Ali, S. F., Dervishi, E., Xu, Y., Li, Z., Casciano, D. ve Biris, A. S., 2010, Cytotoxicity effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in neural phaeochromocytoma-derived PC12 cells, *ACS nano*, 4 (6), 3181-3186.

Zhang, Y., Xiu, W., Gan, S., Shan, J., Ren, S., Yuwen, L., Weng, L., Teng, Z. ve Wang, L., 2019, Antibody-Functionalized MoS2 Nanosheets for Targeted Photothermal Therapy of Staphylococcus aureus Focal Infection, *Frontiers in bioengineering biotechnology*
7, 218.

Zhao, R., Kong, W., Sun, M., Yang, Y., Liu, W., Lv, M., Song, S., Wang, L., Song, H. ve Hao, R., 2018, Highly stable graphene-based nanocomposite (GO–PEI–Ag) with broad-spectrum, long-term antimicrobial activity and antibiofilm effects, *ACS Applied Materials Interfaces*
10 (21), 17617-17629.

Zhao, Y., Dunn, A., Lin, J. ve Shi, D., 2019, Photothermal Effect of Nanomaterials for Efficient Energy Applications, In: Novel Nanomaterials for Biomedical, Environmental and Energy Applications, Eds: Elsevier, p. 415-434.

Zharov, V. P., Mercer, K. E., Galitovskaya, E. N. ve Smeltzer, M. S., 2006, Photothermal Nanotherapeutics and Nanodiagnostics for Selective Killing of Bacteria Targeted with Gold Nanoparticles, *Biophysical Journal*
90 (2), 619-627.

Zhou, J., Ralston, J., Sedev, R. ve Beattie, D. A., 2009, Functionalized gold nanoparticles: synthesis, structure and colloid stability, *J Colloid Interface Sci*, 331 (2), 251-262.

Zhu, W., Michalsky, R., Metin, O. n., Lv, H., Guo, S., Wright, C. J., Sun, X., Peterson, A. A. ve Sun, S., 2013, Monodisperse Au nanoparticles for selective electrocatalytic reduction of CO2 to CO, *Journal of the American Chemical Society*, 135 (45), 16833-16836.

Zhu, Y., Ramasamy, M. ve Yi, D. K., 2014, Antibacterial activity of ordered gold nanorod arrays, *ACS Appl Mater Interfaces*, 6 (17), 15078-15085.

Zou, F., Zhou, H., Jeong, D. Y., Kwon, J., Eom, S. U., Park, T. J., Hong, S. W., Lee, J. ve interfaces, 2017, Wrinkled surface-mediated antibacterial activity of graphene oxide nanosheets, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9 (2), 1343-1351.

Zou, X., Zhang, L., Wang, Z. ve Luo, Y., 2016a, Mechanisms of the Antimicrobial Activities of Graphene Materials, *Journal of the American Chemical Society*, 138 (7), 2064-2077.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	İlknur AKSOY
Uyruğu	**:**	Türk
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	İstanbul/1994
Telefon	**:**	05319574326
Faks	**:**	
e-mail	**:**	ilknuraksoy1@gmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	**Kadir Has Anadolu Lisesi, Maltepe, İstanbul**	**2012**
Üniversite	:	**Gebze Teknik Üniversitesi, Gebze, Kocaeli**	**2017**
Yüksek Lisans	:	**Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya**	**2020**
Doktora	:		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**
2019-Halen	**Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi**	**Araştırma Görevlisi**

UZMANLIK ALANI

YABANCI DİLLER
İngilizce YÖKDİL: 96,25

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR

İlknur Aksoy, Hüseyin Küçükkeçeci, Fatih Sevgi, Önder Metin, Imren Hatay Patir, "Photothermal Antibacterial and Antibiofilm Activity of Black Phosphorus/Gold Nanocomposites against Pathogenic Bacteria", *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12 (24), 26822–26831.

ULUSLARARASI KONFERANS BİLDİRİLERİ

İlknur Aksoy, Hüseyin Küçükkeçeci, Fatih Sevgi, Önder Metin, İmren Hatay Patır, Photothermal Antibacterial Activity of BP-based Nanohybrids Against a Nosocomial Pathogen *Enterococcus faecalis*, 2nd Eurasia Biochemical Approaches Technologies Congress, Antalya, 2019.

İlknur Aksoy, Hüseyin Küçükkeçeci, Fatih Sevgi, Önder Metin, İmren Hatay Patır, Black Phosphorus Based Nanocomposites for Antibacterial Effect against *Staphylococcus aureus*, BioTürkiye Uluslarası Biyoteknoloji Kongresi, İstanbul, 2020.

Esra Ceran, Talha Kuru, **İlknur Aksoy**, Hüseyin Küçükkeçeci, Önder Metin, İmren Hatay Patır, Antibacterial Performance of Au-C_3N_4 Nanocomposites, BioTürkiye Uluslarası Biyoteknoloji Kongresi, İstanbul, 2020.